THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Pierre CHIBON

1re THÈSE : Analyse expérimentale de la régionalisation et des capacités morphogénétiques de la crête neurale chez l'Amphibien Urodèle *Pleurodeles waltlii* Michah.

2e THÈSE : L'acquisition de la pigmentation spécifique chez les Vertébrés.

Soutenues le 2 mai 1966 devant la Commission d'examen.

MM. GALLIEN *Président.*
WOLFF
HOUILLON } *Examinateurs.*

LONS - LE - SAUNIER
IMPRIMERIE MAURICE DECLUME
—
1966

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Pierre CHIBON

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

1re THÈSE : Analyse expérimentale de la régionalisation et des capacités morphogénétiques de la crête neurale chez l'Amphibien Urodèle *Pleurodeles waltlii* Michah.

2e THÈSE : L'acquisition de la pigmentation spécifique chez les Vertébrés.

Soutenues le 2 mai 1966 devant la Commission d'examen.

MM. GALLIEN *Président.*
WOLFF
HOUILLON } *Examinateurs.*

LONS - LE - SAUNIER
IMPRIMERIE MAURICE DECLUME
—
1966

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen ..... M. ZAMANSKY.

PRENANT ..... T Anatomie et histologie comparée.
GRASSÉ ..... T Evolution des êtres organisés.
PRÉVOST ..... T Chimie organique.
WYART ..... T Minéralogie et cristallographie.
TEISSIER ..... T Zoologie.
AUGER ..... T Physique quantique et relativité.
MONNIER ..... T Physiologie générale.
PIVETEAU ..... T Paléontologie.
ROCARD ..... T Physique (E.N.S.).
CARTAN ..... T Mathématiques (E.N.S.).
LAFFITTE ..... T Chimie générale.
N... ..... T Géométrie supérieure.
COULOMB ..... T Physique du globe.
Mlle COUSIN ..... T Biologie anim. (S.P.C.N.).
CHRÉTIEN ..... T Chimie minérale.
BOCQUET ..... T Zoologie.
KASTLER ..... T Physique (E.N.S.).
EPHRUSSI ..... T Génétique.
GAUTHERET ..... T Biologie vég. (C.P.E.M.).
LUCAS R. ..... T Recherches physiques.
THOMAS A. ..... T Biologie cellulaire.
MORAND ..... T Physique (Enseignement).
SOLEILLET ..... T Physique (C.P.E.M.).
FORTIER ..... T Mécanique expérimentale des fluides.
DRACH ..... T Zoologie.
QUENEY ..... T Météorologie et dynamique atmosphérique.
GALLIEN ..... T Embryologie.
EICHORN ..... T Botanique.
DE CUGNAC ..... T Biologie végét. (S.P.C.N.).
Mlle CAUCHOIS ... T Chimie physique.
THELLIER ..... T Physique du globe.
PONCIN ..... T Mécanique générale.
DUBREIL ..... T Arith. et théorie des nombres.
QUELET ..... T Chimie organique.
CAGNIARD ..... T Géophysique appliquée.
CHAMPETIER ..... T Chimie macromoléculaire.
CUVILLIER ..... T Micropaléontologie.
JUNG ..... T Géologie.
TRILLAT ..... T Microscopie et diffraction électronique.
WIEMANN ..... T Chimie organique et structurale.
VASSY ..... T Physique de l'atmosphère.
DESTOUCHES ..... T Théorie physique.
AMIEL ..... T Chimie générale.
HOCART ..... T Minéralogie et cristallographie.
J.-P. MATHIEU ... T Physique optique.
COUTEAUX ..... T Cytologie.
CHOQUET ..... T Théorie des fonctions et topologie.
FELDMANN ..... T Biologie végétale marine.
JOST ..... T Physiologie comparée.
FORTET ..... T Calcul des probabilités et physique math.
SCHWARTZ ..... T Calcul dif. et intégral.
CHOUARD ..... T Physiologie végétale.
MALAVARD ..... T Aviation (technique aéronautique).
BRELOT ..... T Analyse supérieure.
NORMANT ..... T Synthèse organique.
BÉNARD ..... T Chimie appliquée.
DUGUE ..... T Statistiques math.
SOULAIRAC ..... T Psychophysiologie.
ULRICH ..... T Physiologie végét. appl.
KIRRMANN ..... T Théories chimiques.
CHADEFAUD ..... T Botanique.
Mlle LE BRETON .. T Physiol. de la nutrition.
LELONG ..... T Application de l'analyse à la géométrie.
DEVILLERS ..... T Anatomie et histologie comparées.
EHRESMANN ..... T Topologie algébrique.
FRANÇON ..... T Physique (S.P.C.N.).
GLANGEAUD ..... T Géographie physique, géologie dynamique.
DODEMENT ..... T Mathématiques (M.G.P.).
PISOT ..... T Technique mathématique de la physique.
ROCH ..... T Géologie.
SCHATZMANN ..... T Astrophysique.
TERMIER ..... T Géologie générale.
ZAMANSKY ..... T Mathématiques générales.
LENNUIER ..... T Physique (M.G.P.).
ROUTHIER ..... T Géologie appliquée.
Mme TONNELAT .. T Physique théorique.
DIXMIER ..... T Mathématiques (M.P.C.).
SOUCHAY ..... T Chimie générale.
AIGRAIN ..... T Electrotechnique.
BRUSSET ..... T Chimie systématique.
LÉVY ..... T Physique théorique des hautes énergies.
Mme CHAIX ..... T Chimie biologique.
Mme HUREL-PY .. T Biologie végét. (C.P.E.M).
PANNETIER ..... T Chimie générale I.
BRUN ..... T Mécanique des fluides I.
Mme DUBREIL ... T Mathématiques (Agrég.).
Mme LELONG .... T Math. II (E.N.S.).
BELLAIR ..... T Géologie (S.P.C.N.).
COTTE ..... T Physique électricité.
DUBOIS J.-E. ..... T Chimie organique phys.
LAMOTTE ..... T Zoologie (E.N.S.).
OLMER ..... T Energétique générale.
GAUTHIER ..... T Mécanique appliquée.
BARCHEWITZ ..... T Chimie physique.

Brossel	T	Physique atomique.
Buser	T	Physiologie comparée.
Camus	T	Physiologie végétale.
Curien	T	Minéralogie et cristallographie
Possompes	T	Zoologie.
Pullmann	T	Chimie quantique.
Teillac	T	Physique nucléaire et radio-activité.
Ville	T	Econométrie.
Willemart	T	Chimie (C.P.E.M.).
Freymann	T	Recherches physiques.
Rollet	T	Chimie minérale.
Mlle Josien	T	Chimie (S.P.C.N.).
Chevalley	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes.
Germain	T	Mécanique théorique des fluides.
Lucas G.	T	Géologie.
Allard	T	Chimie physique.
Berthelot	T	Physique des particules fondamentales.
Bricard	T	Météorologie.
Mme Albe-Fessard	T	Psychophysiologie.
Julia M.	T	Etudes des molécules naturelles complexes.
Magat	T	Physico-chimie des rayonnements.
Mlle Quintin	T	Electrochimie.
Monod	T	Chimie du métabolisme.
De Possel	T	Analyse numérique.
Charlot	T	Chimie analytique.
Chatelet	T	Chimie (C.P.E.M.).
Mattler	T	Physique (S.P.C.N.).
Bouissières	T	Radiochimie.
Mme Couture	T	Thermodynamique et mécanique physique.
Franc	T	Biologie animale (C.P.E.M.).
Schnell	T	Botanique tropicale.
Stolkowski	T	Physiologie générale.
Acher	T	Chimie biologique.
Baudoin	T	Biologie animale (C.P.E.M.).
Beaumont		Biologie anim. (S.P.C.N.).
Blamont		Géophysique ionosphère.
Boureau	T	Botanique.
Curie D.		Physique (M.G.P.).
Durand-Delga	T	Géologie
Heller	T	Physiologie végétale.
Tortrat	T	Calcul des probabilités.
Cailleux	T	Géologie (S.P.C.N.).
Magnan		Physique électricité.
Daudel	T	Mécanique ondulatoire.
Mlle Fourcroy		Biologie végét. (S.P.C.N.).
Mme Choquet-Bruhat		Mécanique analytique et mécanique céleste.
Mlle Veil	T	Physiologie générale.
Lwoff	T	Microbiologie.
Siestrunck	T	Mécanique physique et expérimentale.
Cabannes	T	Mécanique générale.
Caire		Géographie physique et géologie dynamique.
Comolet		Mécanique des fluides.
Delloue	T	Physique de l'exosphère.
Houillon		Biologie animale (C.P.E.M.).
Olivier		Anthropologie.
Samuel	T	Math. (E.N.S. fémin.).
Thiry	T	Mécanique céleste.
Abéles	T	Physique (S.P.C.N.).
Amat	T	Thermodynamique.
Auboin	T	Géologie.
Mme Benoit-Gueutal	T	Physique nucléaire et radio-activité.
Bougis		Biologie végétale marine (Villefranche-sur-Mer)
Rigaudy	T	Chimie (S.P.C.N.).
Collongues		Chimie (C.P.E.M.).
Dubert		Biochimie.
Nozières		Physique générale.
Cadiot		Chimie organique.
Ivanoff		Océanographie physique.
François		Zoologie.
Talbot		Génie chimique.
Mme Nougarède		Botanique.
Bruhat	T	Mathématiques (M.P.C.)
Fournet		Electricité générale.
Deheuvels	T	Mathématiques propéd.
Furon	T	Géologie (S.P.C.N.).
Mme Gans	T	Génétique.
Genevès		Biologie végétale (C.P.E.M.).
Hupe	T	Pétrographie.
Hollande	T	Biologie générale.
Lions	T	Analyse numérique.
Maitte	T	Chimie organique.
Nicolas		Géologie appliquée.
Panigel		Biologie générale.
Ravier	T	Pétrographie.
Morel F.		Physiologie comparée.
Roseau	T	Mécanique théorique de fluides.
Roubine		Electronique (E.S.E.).
Silber	T	Chimie (C.P.E.M.).
Uebersfeld	T	Electronique.
Yvon	T	Théories physiques.
Hervé	T	Mathématiques.
Mme Pecker-Wimel	T	Astrophysique.
Balkansky		Physique (M.P.C.).
Le Corre	T	Electricité.
Nataf	T	Physique nucléaire et radioactivité
Echalier		Biologie animale (C.P.E.M.).
Barraud		Physiologie (C.P.E.M.).
Dars		Géologie structurale géologie appliquée.
Camefort	T	Botanique (Agrégation).
Vichniewsky	T	Mécanique industrielle.
Sigwalt	T	Chimie (S.P.C.N.).
Blaquière		Electronique.
Baruch		Physique propéd.
Arnous	T	Physique théorique.
Slonimski		Génétique.
Malliavin	T	Math. propéd.
Gaudemar		Chimie propéd.
Brousse	T	Mécanique théorique.
Rosch	T	Astronomie.
Guy	T	Physique expérimentale.
Lazard		Mathématiques (M.P.C.).
Morel P.		Physique (M.P.C.).
Arsac		Programmation.
Lefebvre		Chimie (M.P.C.).
Bok		Physique propéd.
Chapeville		Biochimie.
Benoit		Physique (C.P.E.M.).
Rio		Chimie (C.P.E.M.).
Jauzein		Géologie (E.N.S.).
Prévost G.		Biologie végét. (C.P.E.M.)
Favard P.		Biologie anim. (C.P.E.M.)
Mme Charniaux-Cotton		Evolution des êtres organisés.
Mlle Ficini		Chimie (C.P.E.M.).
Lequeux		Astronomie.
Cohen Tannoudji		Physique atomique.
Tavernier		Physique (C.P.E.M.).
Durand M.		Biologie anim. (S.P.C.N.).
Pascaud		Physiologie.
Mme Petit		Biologie anim. (C.P.E.M.).
Cagnac		Physique (Agrég.).
Falk-Vairant		Phys. nucléaire.

Krasner	T	Mathémathiques.
Benzecri	T	Statistiques.
Vinh Mhu		Physique (M.G.P.).
Duquesnes		Physique (C.P.E.M.).
Schutzenberger		Programmation.
Tremillon		Chimie (M.P.C.).
Fayard		Chimie (M.P.C.).
Buvet		Chimie (C.P.E.M.).
Authier		Physique (M.P.C.).
Picinbono	T	Physique (C.P.E.M.).
Bonnefille		Electrotechnique.
Mme Puiseux Dao		Biologie végétale.

Secrétaire général ..... R. Poullain.

FACULTÉ DES SCIENCES D'ORSAY

PROFESSEURS

Mangenot G.	T	Biologie végétale.
Jacquinot P.	T	Optique.
Guinier A.	T	Electricité et physique des solides.
Grivet P.	T	Electronique.
Blanc-Lapierre A.	T	Accélérateur linéaire.
L'Héritier P.	T	Génétique des virus.
Lemée G.	T	Ecologie végétale.
Moyse A.	T	Physiologie végétale.
Dode M.	T	Chimie thermodyn.
Deny J.	T	Mathématiques.
Rivière A.	T	Géologie générale et sédimentologie.
Michel A.	T	Chimie minérale.
May R.	T	Anatomie comparée.
Delange H.	T	Mathématiques.
Chapelle J.	T	Physique expérimentale.
Lacombe P.	T	Métallurgie.
Benoit P	T	Physiologie générale.
Guinochet J.	T	Biologie végét. S.P.C.N.
Néron A.	T	Mathématiques.
Nozeran R.	T	Botanique approfondie.
Castaing R.	T	Thermodynamique.
Ellenberger F	T	Géologie structurale.
Lederer E.	T	Chimie biologique.
Rizet J.	T	Génétique.
Lender T.	T	Biologie animale S.P.C.N.
Poitou G.	T	Mathématiques.
Fréon P.	T	Chimie organique.
Tonnelat	T	Biologie physico-chimique
Brunn Jan	T	Géologie historique.
Jean M.	T	Physique nucléaire.
Bergerard J.	T	Zoologie.
Roger J.	T	Paléontologie.
Lefort M.	T	Chimie nucléaire.
Lagarrigue A.	T	Physique des hautes énergies.
Jullien J.	T	Chimie structurale organique.
Arnulf A.	T	Optique.
Rouault M.	T	Diffraction électronique.
Maréchal A.	T	Optique théo. et appl.
Mazet R.	T	Mécanique générale.
David Serge	T	Chimie agrégation.
Guérin H	T	Chimie des gaz et des combustibles.
Lesieur L.	T	Mathématiques M.P.C. et algèbre.
Kourganoff	T	Astronomie.
Arnoult P.	T	Physique électronique.
Kahane J.P.	T	Mathématiques.
Brochard J.	T	Physique propédeutique.
Mme Roizen	T	Physique C.P.E.M.
Bertein F.	T	Electronique.
Malgrange B.	T	Mathématiques.
Corabœuf E.	T	Physiologie animale.
Friedel J.	T	Physique des solides.
Chevaugeon J.	T	Cryptogamie.
Meyer P.	T	Physique théorique et atomique.
Lehmann P.	T	Accélérateur linéaire.
Chabbal R.	T	Physique propédeutique.
Delcroix J.M.	T	Physique des plasmes.
Cerf J.	T	Mathématiques.
D'espagnat B.	T	Physique théorique.
Schæffer P.	T	Microbiologie.
De Gennes P.	T	Physique des solides.
Mme Marty N.		Physique propédeutique.
Gourdin M.		Physique théorique.
Perez Y Jorba		Physique propédeutique.
Gorenflot E.		Biologie végétale S.P.C.N.
Riou M.		Physique nucléaire.
Brousse R.		Géologie S.P.C.N.
Lioret C.		Physiologie végétale.
Clauser H		Chimie biologique.
Jancovici B.		Physique atomique.
Lurcat J.		Physique propédeutique.
Le Berre J.		Entomologie.
Lavorel J.		Biophysique.
Perio P.		Physique propédeutique.
Fétizon M.		Stéréochimie.
Chemla M.		Chimie des isotopes.
Mazieres C.		Chimie S.P.C.N.
Vilkas .M.		Chimie C.P.E.M.
Blandin A.		Physique des solides.
Brun G.		Génétique.
Mercouroff		Physique agrégation.
André J.		Microscopie électronique.
Chevallier F.		Physiologie animale.
Mlle Marcou		Biologie cellulaire C.P.E.M.
Bourdu R.		Physiologie végétale.
Berkaloff A.		Biologie animale C.P.E.M.
Mlle Lefort M		Biologie cellulaire C.P.E.M.
Mme Lambert		Physique C.P.E.M.
Bizot J.C		Physique M.P.C.
Guiraud J.P.		Mécanique.
Labouesse B.		Chimie S.P.C.N.

SOMMAIRE.

Avant-Propos 6

Introduction. Historique 7

But et plan des recherches 12

Matériel et techniques 13

Recherches expérimentales 23

A. Mise en évidence de la migration précoce des cellules de la crête neurale 23

I. Pose de marques colorées 23

II. Greffes orthotopiques de crête neurale marquée 27

B. Dérivés de la crête neurale céphalique 28

I. Squelette crânien 28

II. Dents 43

III. Mésenchyme 49

IV. Ganglions crâniens 51

V. Encéphale antérieur 61

VI. Cellules pigmentaires 64

C. Dérivés de la crête neurale troncale 67

I. Squelette axial 67

II. Ganglions rachidiens 70

III. Cellules de Rohon-Béard 74

IV. Cellules de la gaine de Schwann 77

V. Cellules pigmentaires 82

VI. Mésenchyme et méninges 85

VII. Ganglions sympathiques et cellules chromaffines ... 87

Conclusions générales 94

Résumé 98

Summary 100

Bibliographie 102

AVANT-PROPOS

Les recherches exposées dans ce Mémoire ont été réalisées au Laboratoire d'Embryologie de la Faculté des Sciences de Paris. Le sujet m'en a été proposé par Monsieur le Professeur GALLIEN, Membre de l'Institut. C'est pour moi un agréable devoir de lui exprimer ici mes plus vifs remerciements et toute ma gratitude pour ses conseils, ses critiques, ses suggestions durant tout le cours de ce travail, et pour la formation scientifique que j'ai reçue dans son Laboratoire. Comme Assistant d'abord, puis comme Chercheur rattaché à son Laboratoire, j'ai pu apprécier l'atmosphère stimulante créée autour de lui par Monsieur le Professeur GALLIEN, et j'ai pu bénéficier des facilités de travail qu'il a rassemblées. Enfin, je le remercie respectueusement de l'honneur qu'il me fait en présidant mon Jury de Thèse.

Monsieur le Professeur WOLFF, Membre de l'Institut, a bien voulu accepter, malgré ses lourdes charges, de faire partie de ce Jury, et de juger mon travail. C'est pour moi un grand honneur et je l'en remercie profondément.

La présence de Monsieur le Professeur HOUILLON dans ce Jury est aussi pour moi une joie. Je n'oublie pas que c'est lui qui, à mon arrivée au Laboratoire, m'a initié concrètement au travail scientifique. Je le remercie bien vivement de l'intérêt qu'il a toujours porté à mon travail.

J'exprime à Monsieur le Professeur BRACHET, de l'Université Libre de Bruxelles, tous mes remerciements pour l'aide et les conseils que j'ai reçus dans son Laboratoire, de lui-même et de ses collaborateurs.

L'amitié de mes Collègues et du personnel du Laboratoire d'Embryologie m'a toujours été extrêmement précieuse : je prie chacun de trouver ici l'expression de mon amicale gratitude.

Je remercie la Société Zoologique de France qui a accepté de publier ce travail dans ses *Mémoires* (tome 36, 1966).

INTRODUCTION

La neurulation est un phénomène très remarquable qui a depuis longtemps frappé les Embryologistes. Il présente une grande homogénéité dans l'ensemble de l'embranchement des Vertébrés : le soulèvement, l'affrontement, puis la fusion des bourrelets médullaires, constituent l'évolution directement observable de la première ébauche embryonnaire extérieurement visible. Sur cette ébauche superficielle, les interventions expérimentales sont relativement aisées et ont été pratiquées depuis près d'un siècle.

Si l'on se limite à une observation externe des phénomènes de neurulation, on parle habituellement des « bourrelets médullaires », qui sont constitués par une étroite bande d'ectoderme qui se soulève tout autour de la plaque neurale : la plaque neurale étant très élargie en avant, étroite et rectiligne en arrière, les bourrelets médullaires sont sensiblement circulaires dans la région antérieure, rectilignes et parallèles dans la région postérieure. Leurs limites se définissent aisément ; les bourrelets médullaires sont le territoire ectodermique soulevé. Chez le Pleurodèle, leur limite interne est de plus soulignée par une ligne fortement pigmentée en brun.

A la suite de la découverte de His (1868) selon laquelle les ganglions spinaux sont issus des bourrelets médullaires, ceux-ci ont été souvent appelés « crêtes ganglionnaires ». Mais on sait maintenant que beaucoup d'autres formations dérivent également des « crêtes ganglionnaires », et le terme plus général de « crête neurale » est aujourd'hui le plus employé.

Dans tout notre travail, nous désignerons par le terme de « crêtes neurales » aussi bien les bourrelets soulevés tout autour du neuroblaste, que les cellules issues de ceux-ci, qui migrent dès le moment de leur fusion (fermeture du tube nerveux) pour gagner toutes les parties de l'embryon. On peut intervenir expérimentalement au stade neurula sur la crête neurale ainsi définie.

En montrant que les ganglions spinaux dérivent de la crête neurale, His précisait déjà que les cellules de la crête neurale, ou tout au moins une partie d'entre elles, ont la propriété de se déplacer par leurs propres moyens, de migrer au milieu des autres cellules embryonnaires, pour se disperser ou au contraire se rassembler en des points précis, et ainsi donner naissance aux nombreux tissus ou organes qui feront l'objet de notre étude.

Ce remarquable pouvoir de migration des cellules de la crête neurale a été considéré par les auteurs de façons opposées : ou bien, il serait la cause de difficultés expérimentales et de difficultés pour

l'interprétation des résultats obtenus, ou bien, au contraire, il constitue une disposition privilégiée qui permet de dissocier aisément le rôle joué dans la formation d'un même organe par des cellules d'origines distinctes. Dans toutes les recherches expérimentales, ces deux aspects presque opposés du même phénomène sont intimement liés, et rendent particulièrement souhaitable de disposer de techniques permettant d'abord de suivre cette migration dans les conditions normales et expérimentales, et ensuite de discerner la participation des cellules migratrices à la formation de tels ou tels organes complexes.

L'utilisation des méthodes de « marquage » qui visent à imposer aux cellules migratrices des caractères particuliers, permet de les identifier ultérieurement, avec une sûreté absolue.

Dans ce but, ont été utilisées, à la suite de Vogt (1925, 1929), les marques colorées : celles-ci se sont révélées très utiles, mais encore insuffisantes : le colorant diffuse dans les cellules voisines, et le marquage s'efface tout en devenant moins sélectif. Ont été également mises à profit les différences de pigmentation ou de taille entre les cellules de différentes espèces : des greffes interspécifiques sont toujours possibles chez les embryons d'Amphibiens, et sont presque toujours bien supportées : un tel « marquage » ne s'efface pas, mais l'étude des préparations histologiques est extrêmement longue. De plus, les études récentes montrent que, en réalité, des phénomènes immunologiques interviennent et peuvent fausser considérablement les résultats.

Nous avons, quant à nous, recherché un moyen de marquage à la fois sélectif, durable, et réalisable à l'intérieur d'une même espèce. Ces qualités, quelque peu contradictoires, sont cependant réunies d'une manière qui s'est révélée extrêmement satisfaisante par le marquage « nucléaire » des cellules de la crête neurale que nous avons mis au point (1962).

Historique.

Béard (1889) partage les conceptions de His (1879), d'après lesquelles il y a lieu de distinguer dans l'ectoderme trois régions de potentialités bien différentes : la plaque neurale, la crête neurale (Zwischenstrang) et l'ectoderme banal (Hornblatt).

Balfour (1878), décrivant la crête neurale chez les Sélaciens, affirme qu'elle donne naissance aux racines dorsales des ganglions spinaux et considère qu'elle représente une partie de la moelle épinière elle-même. Cette opinion est partagée par Sagemehl (1882) et Kastchenko (1888).

Cependant Brachet (1908) estime que la crête neurale constitue une ébauche distincte de la moelle épinière, et, depuis cette époque, les auteurs considèrent la crête neurale en elle-même, comme une ébauche située tout autour de la plaque neurale, mais distincte du système nerveux proprement dit.

Le remarquable pouvoir de migration des cellules de la crête neurale est mis en relief par les travaux de Goronowitsch (1892, 1893) et de Platt (1893, 1897) qui montrent que le mésenchyme de la tête et aussi les cartilages des arcs viscéraux et l'ivoire des dents dérivent de l'ectoderme. Elle propose le terme de « mésectoderme » pour désigner ce mésenchyme d'origine ectodermique.

Les premières études consacrées particulièrement aux dérivés de la crête neurale sont celles de Landacre (1921) qui montre que la crête neurale est à l'origine de très nombreuses formations : les ganglions rachidiens et crâniens, les cartilages de la tête, le mésenchyme. Stone (1922 a et b, 1924, 1926, 1927, 1929, 1932) étudie la migration des cellules issues de la crête neurale, l'origine des ganglions crâniens, et montre, contrairement aux conclusions de Landacre, que ceux-ci dérivent pour leur plus grande partie, non pas de la crête neurale, mais de placodes ectodermiques. Il montre également qu'au stade bourgeon caudal, le mésectoderme céphalique greffé dans le tronc donne naissance à des cartilages.

Harrison (1921, 1924, 1925) étudie le développement des branchies et du balancier chez l'embryon d'Amphibien, ainsi que le rôle joué par la crête neurale dans la formation des cellules de la gaine de Schwann.

Knouff (1927) reprenant le problème de l'origine des ganglions crâniens chez *Rana*, conclut qu'ils dérivent en partie de la crête neurale et en partie de placodes ectodermiques. Detwiler (1927, 1937) étudie le développement des ganglions spinaux et des cartilages, et, en collaboration avec Kehoe (1939), l'origine des cellules de la gaine de Schwann : il conclut que les ganglions rachidiens et les cellules de la gaine de Schwann sont issus de la crête neurale. Van Campenhout (1930 a et b, 1931), chez le poulet, affirme que le système nerveux sympathique dérive de la crête neurale. Il montre (1935) que le ganglion acoustique est issu de la paroi de la vésicule auditive. Raven (1932, 1933 a et b, 1935, 1936, 1937) étudie la migration du matériel cellulaire issu de la crête neurale, puis les possibilités d'autodifférenciation de la crête neurale céphalique et enfin, les dérivés de la crête neurale tronçale. Il considère que tout le squelette céphalique (sauf le 2e basibranchial et la partie postérieure des trabécules), les papilles dentaires, une partie des cellules des ganglions sympathiques, les cellules pigmentaires, dérivent de la crête neurale, mais pas les cellules de la gaine de Schwann. Dushane (1934, 1935, 1938, 1939) montre que les cellules pigmentaires dérivent de la crête neurale ; il confirme l'absence, après ablation de la crête neurale, du mésenchyme et de la nageoire dorsale, des ganglions spinaux, et met en évidence l'absence des cellules de Rohon-Béard dans la moelle épinière ; en 1939, il montre que, dans les deux variétés, noire et blanche, de l'Axolotl, les cellules de la crête neurale sont aptes à produire des pigments. Ce dernier point a été repris par Barden (1942) et Dalton (1949, 1950 a et b, 1953). Yntema (1937, 1943) conclut à une origine mixte des ganglions crâniens,

des nerfs crâniens et des cellules de leur gaine de Schwann, à la fois à partir de la crête neurale et à partir de placodes ectodermiques. Yntema et Hammond (1945, 1947), et Hammond et Yntema (1947) montrent que chez l'embryon de poulet le système nerveux sympathique et les cellules chromaffines dérivent de la crête neurale elle-même, contrairement aux résultats de Kuntz et Batson (1920) et de Kuntz (1922), et de Levi-Montalcini (1947).

Hörstadius et Sellman (1946) précisent la régionalisation de la crête neurale céphalique. Wagner (1949), par des échanges interspécifiques de crête neurale entre Triton et Bombinator, observe, chez les larves receveuses, des crânes dont certaines parties dérivent du greffon étranger, de même que les dents. Twitty et Bodenstein (1944) et Niu (1947) étudient en culture d'explants la différenciation et le comportement des cellules pigmentaires. Ils étudient l'influence des tissus environnants sur la migration et la répartition des cellules pigmentaires. Lehmann (1950) constate, après des greffes interspécifiques de crête neurale, que des premières cellules pigmentaires différenciées empêchent la différenciation des autres cellules pigmentaires. Piatt (1951) montre que la crête neurale ne participe pas à la formation des ganglions crâniens (contrairement aux résultats de Landacre, Knouff et Yntema), ni des ganglions sympathiques (contrairement aux résultats de Yntema et Hammond), mais qu'elle produit au moins une partie des cellules de la gaine de Schwann. Raunich (1951) montre que le télencéphale dérive de la crête neurale. Okada (1955) étudie systématiquement tous les dérivés que peut donner en culture la crête neurale. Il peut ainsi préciser le degré de détermination de chacune de ses parties, et dresser un tableau de tous les dérivés obtenus. Triplett (1958), par des greffes interspécifiques entre espèces dont les cellules sont de tailles très différentes, montre que la crête neurale est à l'origine des ganglions sympathiques et des premières cellules de Schwann.

Abordant les problèmes physiologiques, Wilde (1951, 1955 a et b, 1956) conclut, en particulier, que l'endoderme pharyngien joue un rôle inducteur vis-à-vis de la crête neurale céphalique et la rend apte à différencier du tissu cartilagineux. Il met en évidence le fait que les processus de différenciation en culture sont contrôlés par certains métabolites, en particulier la phényl-alanine et la tyrosine, qui, dans les conditions normales, sont très probablement fournies par les cellules du toit de l'archentéron.

Dans la même ligne de recherche, Petriconi (1964) montre que seuls, les explants de crête neurale céphalique ayant subi l'action la plus prolongée d'un extrait endodermique produisent du cartilage. Ce travail conclut dans le sens du précédent et permet de comprendre les résultats de Newth (1954), qui, implantant des fragments de crête neurale céphalique dans le flanc, n'obtient pas la formation de cartilage, et de Ichikawa (1933 a et b, 1937) qui, en prélevant au stade bourgeon caudal les cellules de la crête neurale parvenues à ce moment sur les parois pharyngiennes, avait obtenu dans tous les cas la formation de cartilages.

La réalisation du type de pigmentation de la peau, avec ses dessins particuliers a fait l'objet des travaux de La Spina (1963) qui, sur le Discoglosse, montre que le type de pigmentation qui se réalise à la métamorphose est, dans tous les cas, celui de la variété donneuse de la crête neurale. Volpe (1963) met également à profit l'existence dans l'espèce *Rana pipiens* de deux variétés de pigmentations différentes pour montrer après échanges de crête neurale entre les deux variétés, que la pigmentation obtenue est celle qui est propre à la crête neurale greffée ; il met en outre en évidence (1964) l'existence de phénomènes d'incompatibilité entre les tissus des deux variétés, qui aboutissent dans la plupart des cas à une destruction ou à un rejet des cellules greffées : les dérivés de la crête neurale se différencient normalement, puis se désintègrent, dans beaucoup de cas, au moment de la métamorphose.

Enfin Weston (1963) étudie chez l'embryon de poulet la migration et la localisation des cellules de la crête neurale troncale après marquage de celle-ci par la thymidine tritiée. Il met en évidence l'existence de deux voies de migration, sous l'ectoderme superficiel, et entre le tube nerveux et les somites. Il apporte des arguments en faveur de l'origine à partir de la crête neurale d'une partie des cellules de Schwann et des éléments sympathiques.

Johnston (1964) utilise la même méthode de marquage nucléaire pour l'étude, également chez le poulet, des dérivés de la crête neurale céphalique.

BUT ET PLAN DES RECHERCHES.

Notre travail a consisté à envisager, chez le Pleurodèle, l'ensemble des capacités morphogénétiques de la crête neurale, c'est-à-dire à étudier tous les dérivés de la crête neurale, en établissant sa régionalisation.

Nous avons voulu pour cela nous placer dans des conditions expérimentales rigoureuses : toutes nos interventions expérimentales ont été pratiquées au même stade de développement ; la fixation des animaux opérés a été faite à deux ou trois stades seulement, de manière que les différentes séries opératoires soient bien comparables. Nous avons utilisé les méthodes classiques de l'Embryologie expérimentale employées avant nous par les auteurs que nous avons cités, en réalisant la pose de marques colorées, en opérant des ablations et des greffes de crête neurale suivant des combinaisons très nombreuses, en cultivant des explants de crête neurale isolée.

Mais ces méthodes s'étant révélées inadéquates pour résoudre plusieurs problèmes, nous avons introduit une méthode expérimentale nouvelle : le marquage nucléaire de la crête neurale par la thymidine tritiée. Une méthode identique vient d'être utilisée avec succès par Weston pour des études similaires chez l'embryon de poulet.

Après avoir rapporté les méthodes et techniques utilisées dans notre travail, nous rendrons compte de nos recherches concernant les dérivés de la crête neurale céphalique, puis de la crête neurale troncale. A propos de chacun d'eux, nous envisagerons les résultats apportés par chacune des méthodes employées, et nous discuterons nos résultats en les comparant à ceux des auteurs antérieurs.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

1) Espèces utilisées.

Nos recherches ont été réalisées presque exclusivement sur le triton *Pleurodeles waltlii* Michah. Les conditions d'élevage et d'obtention des pontes de cette espèce ont été exposées par Gallien (1952). Le Pleurodèle se révèle un matériel très avantageux par la facilité de son élevage, la fécondité des femelles et la facilité d'intervention sur l'embryon, qui n'est enveloppé d'aucune coque épaisse.

Quelques séries opératoires ont été réalisées en utilisant *Triturus alpestris* ; les conditions d'élevage de cette espèce sont dans l'ensemble identiques à celles du Pleurodèle, mais les mâles et les femelles sont maintenus ensemble.

2) Techniques opératoires.

Toutes nos interventions expérimentales sur la crête neurale ont été réalisées sur la neurula jeune, aux stades 14 ou 15 de la Table de Gallien et Durocher (1957). Ce moment a été choisi parce que les bourrelets médullaires sont alors bien soulevés dans toute la région céphalique et dans la région troncale, sauf à l'extrémité tout-à-fait postérieure de celle-ci, au voisinage du blastopore. La limite interne des bourrelets médullaires ou neuraux est soulignée par une bande pigmentée brune.

Les embryons sont dégangués, puis déchorionnés dans la solution opératoire de Holtfreter et transportés avec une pipette dans la coupelle opératoire stérile. Celle-ci comporte un fond d'agar dans lequel on aménage, au moyen de l'extrémité d'une fine tige de verre chauffée, de petites logettes ayant la taille des embryons ; la coupelle est remplie de solution opératoire de Holtfreter, stérilisée et additionnée d'Elcosine CIBA à raison de 1 ampoule pour 1 litre de solution.

Les embryons, une fois placés dans les logettes, sont prêts à subir l'intervention expérimentale.

a) Pose de marques colorées.

Pour poser des marques colorées, nous avons utilisé des coupelles opératoires dont le fond était garni de pâte à modeler. Sur la crête neurale, en des points rigoureusement déterminés, on pose de minuscules fragments (environ 0,2 × 0,2 mm) d'une pellicule d'agar im-

prégnée d'un colorant vital qui est le Rouge Neutre, ou le Sulfate de Bleu de Nil ; on les maintient en place en tassant légèrement la pâte à modeler autour de la logette, de façon à immobiliser à la fois le fragment d'agar coloré et la neurula.

On laisse le colorant diffuser dans les cellules situées à son contact pendant 5 à 10 minutes, puis on enlève le fragment d'agar coloré en écartant les bords de la logette.

On obtient de cette manière une coloration intense et bien délimitée de la partie de la crête neurale choisie.

On peut poser plusieurs marques colorées sur la même neurula ; on utilise alors alternativement des marques bleues et rouges. Après coloration, les neurulas sont placées dans des coupelles d'élevage. De jour en jour, on observe et on note l'évolution des plages colorées ; la coloration s'atténue peu à peu, au fur et à mesure que les plages colorées s'étendent et que l'embryon grandit ; elle ne dure pas au-delà du 7e ou 8e jour après la pose des marques colorées : l'embryon atteint alors le stade 31 ou 32.

b) Ablations de la crête neurale.

Les conditions opératoires sont les mêmes que dans le cas précédent. On pratique des incisions superficielles, intéressant l'ectoderme seul, tout autour du fragment de crête neurale que l'on veut extirper, puis on le détache délicatement du tissu sous-jacent.

La cicatrisation après ablation se fait aisément, en une heure environ, si la blessure ainsi ouverte est petite ; si la longueur du fragment enlevé atteint ou dépasse 0,5 mm la cicatrisation demande plusieurs heures, et encore ne se réalise-t-elle à coup sûr que si l'ablation a été unilatérale. Si on a pratiqué l'ablation d'une partie de la crête neurale sur les deux côtés de la neurula (ablation bilatérale), les mouvements de fermeture du tube nerveux sont plus lents dans la région opérée et ils amènent face à face deux régions non cicatrisées : la fermeture du tube nerveux ne s'opère pas alors dans de bonnes conditions et, dans un nombre de cas d'autant plus grand que l'ablation a été plus importante, la cicatrisation ne se fait pas, ni la fermeture du tube nerveux, et au bout de deux ou trois jours les embryons se cytolysent en commençant par la région opérée.

Dans toutes nos séries opératoires, les ablations bilatérales sont celles qui cicatrisent le plus difficilement ; les ablations bilatérales des crêtes neurales entières ne sont presque jamais suivies de cicatrisation (dans 3 % des cas environ).

Après opération, les embryons sont transférés dans des coupelles d'élevage et laissés plusieurs jours dans la solution opératoire afin de faciliter autant qu'il est possible leur cicatrisation. Après 4 ou 5 jours, les embryons qui se développent sont placés dans la solution opératoire diluée 10 fois ou même dans l'eau ordinaire.

Au moment où ils commencent à se nourrir, ils sont alimentés avec des larves d'*Artemia salina*, puis des daphnies et ensuite des larves de Chironome.

c) Greffes.

Les opérations de greffes sont préparées comme les ablations : mais, dans la coupelle opératoire, on prend soin de disposer les logettes deux par deux, de façon à juxtaposer la neurula donneuse et la neurula receveuse.

L'ablation du fragment de crête neurale à exciser est réalisée comme il a été décrit au paragraphe précédent ; aussitôt après, on prélève sur la neurula donneuse un greffon dont la taille est égale à celle du fragment de crête neurale enlevé. On prend bien soin de repérer l'orientation de ce greffon, et on le pose en respectant cette orientation sur la région opérée de la neurula receveuse ; avec la boucle de platine on le tasse légèrement sur la plaie, on raccorde les bords du greffon aux bords de la blessure, et on pose par-dessus un fragment de lamelle couvre-objet qui maintient le greffon en place, l'empêche de s'enrouler sur lui-même, et, comprimant légèrement la région opérée, facilite la cicatrisation.

Si toutes ces étapes ont été franchies dans les meilleures conditions et en particulier si le greffon est bien de la taille de la blessure, la cicatrisation ne demande pas plus de 20 à 30 minutes : on peut retirer alors la lamelle de verre et même sortir la neurula receveuse de sa logette.

Si l'on désire réaliser une greffe bilatérale, on répète immédiatement la même opération du côté opposé.

Nous avons ainsi réalisé plusieurs centaines d'opérations en remplaçant un fragment donné de la crête neurale par un autre fragment prélevé dans une région différente de la crête neurale, et ceci d'un seul côté ou des deux côtés ; nous avons également substitué à des fragments de la crête neurale des lambeaux d'ectoderme banal du flanc ou du ventre.

Lorsque la cicatrisation est achevée, les embryons sont transférés dans des coupelles d'élevage et soignés comme nous l'avons exposé précédemment.

Dans la suite de notre travail, nous désignerons par le terme de « greffe orthotopique » l'implantation, sur une partie déterminée de la crête neurale, d'un greffon provenant de la même partie de la crête neurale de la neurula donneuse, et par le terme de « greffe hétérotopique » l'implantation, en une région donnée de la crête neurale, d'un greffon provenant d'une autre partie de la crête neurale de la neurula donneuse (par exemple, la greffe, à la place d'une partie de la crête neurale céphalique, d'un greffon provenant d'une autre partie de la crête neurale céphalique, ou provenant de la crête neurale troncale).

d) Mise en parabiose.

Plusieurs séries d'embryons opérés ont été greffés en parabiose sur des porteurs normaux, afin de leur permettre d'atteindre des stades avancés du développement : le porteur sain pourvoit aux

besoins alimentaires du partenaire opéré, qui est par lui-même incapable de se nourrir (bouche déformée) dans de nombreux cas d'ablation des crêtes neurales céphaliques.

e) Eclaircissements.

Les larves opérées qui grâce à la mise en parabiose ont atteint des stades avancés du développement ont été éclaircies suivant la technique de Lundvall, et les cartilages colorés *in situ* par le bleu de méthylène. De cette façon les cartilages colorés en bleu sont directement visibles à travers les tissus transparents.

f) Marquage nucléaire par la thymidine tritiée.

Nous avons cherché une technique permettant de marquer, de manière aussi durable que possible, les cellules de la crête neurale : en recherchant ensuite sur coupes ces cellules marquées, il serait possible de voir dans quelles régions de l'embryon, puis de la larve, elles se trouvaient, et quels organes elles formaient ou contribuaient à former.

Nous avons utilisé un marquage radioactif des cellules de la crête neurale. On sait depuis les travaux de Friedkin, Tilson et Roberts (1956) et ceux de Hughes et coll. (1958) que la thymidine, nucléoside constitutif de la molécule d'ADN, est susceptible, si elle est présente dans un milieu où se trouvent des cellules en division, d'être incorporée telle quelle par celles-ci, et utilisée par elles pour la synthèse de leur ADN. Les laboratoires spécialisés fabriquent de la thymidine tritiée, dont le comportement biologique est évidemment identique à celui de la thymidine non radioactive et qui, incorporée par des cellules en division, rend radioactifs leurs noyaux. L'ADN nucléaire étant stable et non soumis à renouvellement (« turnover ») (Swick, Koch et Handa, 1956) les noyaux ainsi rendus radioactifs le restent indéfiniment, ou du moins leur radioactivité ne diminue que pour autant qu'ils se divisent (Amano, Messier et Leblond 1959). A partir d'une cellule initiale dont le noyau est marqué, on obtiendra, par divisions successives, une lignée cellulaire dans laquelle chaque cellule sera marquée ; le marquage initial est réparti également entre toutes les cellules-filles, et devient donc de plus en plus faible jusqu'au moment où il finit par disparaître. En outre, la stabilité de l'ADN nucléaire est telle que l'on est assuré, ainsi que l'ont montré Trinkhaus et Gross (1961), qu'il n'y a pas de transfert de matériel radioactif d'une cellule marquée aux cellules non marquées qui l'entourent.

Toutefois cette méthode présente deux limitations : il faut en effet être assuré que l'incorporation d'atomes radioactifs dans le matériel génétique lui-même n'entraîne pas de dommages pour celui-ci. Sauer et Walker (1961) ont, en effet, démontré l'existence de modifications cytologiques analogues à celles que provoquent les rayons X, dans des cellules ayant incorporé de la thymidine tritiée à activité spécifique élevée. Il faudra donc s'assurer que les doses de radioactivité

utilisées sont compatibles avec une vie cellulaire normale. Il faut en outre tenir compte de ce que la cytolyse d'une cellule marquée libère des produits de dégradation de l'ADN marqué, qui peuvent être réutilisés par des cellules voisines pour la synthèse de leur propre ADN : il peut donc y avoir, comme l'ont montré Diderholm, Fichtelius et Linder (1962), transfert de radioactivité d'une cellule morte à des cellules en voie de division.

Nous avons utilisé de la thymidine tritiée de deux provenances différentes : Schwarz Laboratories, Mount Vernon, N. Y., (USA) (solution aqueuse contenant 1 mCi dans 1 ml, d'activité spécifique 360 mCi/millimole), et Centre d'Etudes Nucléaires de Mol (Belgique), (solution aqueuse contenant 1 mCi dans 1 ml, d'activité spécifique 3 Ci/millimole).

Nous avons procédé de la manière suivante : les blastulas (stades 6 et 7 de la Table Gallien et Durocher) sont déganguées, puis transférées dans des coupelles opératoires, dont le fond est garni d'une couche d'agar dans lequel ont été aménagées des logettes, et contenant du Holtfreter stérile additionné d'Elcosine.

Au moyen d'une microaiguille (diamètre 25 à 30 µ) étirée et taillée en biseau à la microforge de Fontbrune, on perce le chorion et la région du pôle animal de la blastula ; à l'aide d'une seringue reliée par un tube souple à la microaiguille, on aspire le liquide blastocélien jusqu'à ce que l'hémisphère animal de la blastula soit fortement déprimé. On retire alors la microaiguille et l'on rejette le liquide aspiré. Avec la même microaiguille, on aspire une quantité de 1 à 2 $\times$ 10^{-4} ml de la solution de thymidine tritiée, et on l'injecte dans le blastocèle par le trou pratiqué précédemment. On prend soin d'injecter une quantité de solution suffisamment faible pour que la blastula n'apparaisse pas gonflée. Au cours d'une série opératoire, nous avons habituellement injecté de cette manière 40 à 50 blastulas.

La solution de thymidine tritiée utilisée était préparée en diluant avec du Holtfreter opératoire les solutions provenant des fournisseurs.

Les blastulas qui cicatrisent normalement sont placées dans la solution de Holtfreter diluée 10 fois, dans laquelle se poursuit leur développement.

Des essais préliminaires nous ont montré que la concentration de la solution de thymidine tritiée injectée ne doit pas dépasser 300 µCi/ml : au-dessus de cette concentration, le développement des germes est perturbé, la gastrulation se fait mal, les neurulas paraissent gonflées, distendues, et beaucoup d'embryons meurent avant d'atteindre l'éclosion. Aussi avons-nous toujours utilisé, pour nos expériences, des concentrations plus faibles, le plus souvent 150, 100 ou même 75 µCi/ml. Dans ces conditions, les blastulas qui cicatrisent bien après l'injection de la solution de thymidine tritiée, poursuivent normalement leur développement, et donnent des larves et même des adultes parfaitement identiques aux témoins. Ni l'injection elle-même ni la dose de radioactivité utilisée ne perturbent donc le développement.

Nous avons vérifié, en fixant des embryons à des intervalles de 1 jour, 3 jours, 4 jours, 7 jours et 10 jours, que toutes les cellules des embryons issus des blastulas injectées possèdent effectivement un noyau marqué : dès le stade gastrula, tous les noyaux de tous les feuillets sont marqués ; au stade neurula et dans les stades suivants, le marquage se révèle inégal ; il reste plus intense dans les territoires et les feuillets où l'activité mitotique est moindre (endoderme, par exemple) (Chibon, 1962). Au stade neurula, qui nous intéresse particulièrement, toutes les cellules et spécialement les crêtes neurales sont bien marquées (Planche II, fig. 10 et 11).

36 à 38 heures après l'injection, on peut réaliser, sur les embryons qui sont alors parvenus au stade neurula, les opérations portant sur la crête neurale : les neurulas non marquées proviennent de la même ponte que les neurulas marquées.

Dans une même coupelle opératoire, on rassemble par paires un certain nombre de neurulas marquées et non marquées, et on pratique les opérations sur la crête neurale comme nous l'avons exposé ci-dessus, en remplaçant des portions déterminées de la crête neurale des neurulas non marquées, par des portions identiques ou différentes de la crête neurale des neurulas marquées, ou encore par des lambeaux d'ectoderme marqué.

On réalise ainsi l'implantation d'un greffon marqué sur une neurula non marquée : fig. 1.

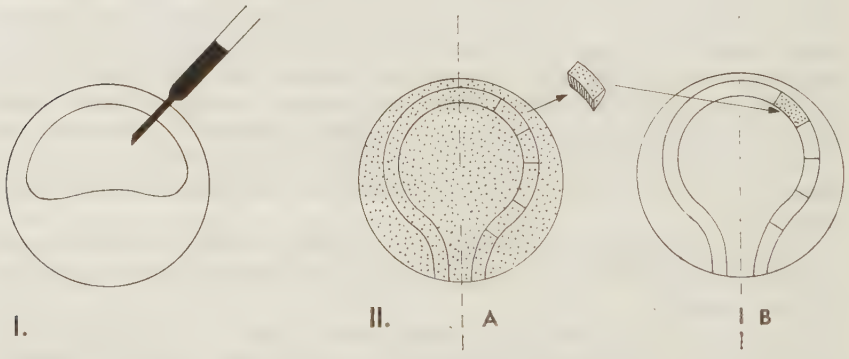

Fig. 1. — Schéma de la méthode de marquage nucléaire par la thymidine tritiée. I : Injection de la solution de thymidine tritiée dans la blastula. II : Prélèvement sur la neurula marquée A d'un fragment de crête neurale, et implantation sur la neurula non marquée B.

Après cicatrisation, les neurulas opérées sont transportées dans des coupelles d'élevage. Les embryons ou les larves sont fixés à des stades divers afin que l'on puisse suivre l'évolution des cellules marquées, et la plupart d'entre eux ne sont fixés qu'au stade 38 ; à ce moment en effet tous les tissus de la larve sont bien différenciés et le marquage nucléaire est encore suffisamment intense.

Pour la fixation des larves, deux techniques ont été utilisées :

1°) Fixation par le mélange alcool éthylique absolu + 5 % acide acétique glacial maintenu à — 8°C (fixation : 10 heures), suivie d'un lavage à l'alcool absolu pendant 12 heures à — 8°C également, et de trois bains de toluène de 1 heure ; le dernier bain de toluène est ramené à la température ordinaire, et l'inclusion est faite à la paraffine à 56°.

2°) Fixation par le fixateur de Smith (bichromate de potassium, formol, acide acétique) pendant 12 heures, puis lavage à l'eau pendant 24 heures, déshydratation progressive par des bains d'alcool éthylique, imprégnation par le toluène et inclusion à la paraffine.

Les coupes sont faites à l'épaisseur de 7,5 µ et collées sur des lames histologiques préalablement recouvertes d'un film de gélatine. Après séchage les coupes sont déparaffinées.

Elles sont alors prêtes à recevoir l'émulsion sensible : nous avons utilisé l'émulsion Ilford L 4 « *in gel form* » : ramollie à une température de 45-50° C, elle est étalée sur les lames portant les coupes à l'aide d'une raclette qui ne frotte que sur le haut et le bas des lames, de manière à déposer sur les coupes elles-mêmes une couche d'émulsion fraîche de 50 µ d'épaisseur. Après séchage, les lames sont placées à l'obscurité dans des boîtes conservées à la température de 12°C : la durée d'exposition est comprise entre quelques jours et 6 mois.

Le développement de l'émulsion est obtenu par un révélateur à l'amidol (Amidol : 1,125 g — Sulfite de sodium anhydre : 4,500 g — Bromure de potassium, solution à 10 % : 2 ml — Eau distillée : 250 ml) (pendant 20 minutes à 14°C), puis la fixation par un bain d'hyposulfite de sodium à tiers de saturation pendant 45 minutes. Les préparations sont lavées à l'eau courante pendant plusieurs heures, soumises pendant 2 heures à un prétraitement par l'alcool éthylique à 70°, qui favorise la diffusion des colorants à travers la gélatine, et enfin colorées.

Nous avons utilisé diverses méthodes de coloration : coloration à l'hématoxyline de Harris ou de Groot, coloration au Rouge Solide (Kernechtrot), coloration de Feulgen (en ce cas, avant pose de l'émulsion) et, le plus souvent, la coloration de l'Unna (Vert de Méthyle-Pyronine) qui colore en vert clair les noyaux, et en rose ou violet le cytoplasme et le vitellus.

Enfin les lames colorées sont de nouveau déshydratées et montées au Baume du Canada.

Les autoradiographies obtenues montrent, au milieu des tissus non marqués de la larve receveuse, des cellules marquées qui dérivent du greffon. La recherche systématique sur les préparations de toutes les cellules marquées permet de savoir exactement dans quels organes et tissus sont parvenues les cellules de la crête neurale : par ce moyen, nous pouvons identifier en tant que tels tous les dérivés de la crête neurale.

Le marquage des cellules se manifeste par une concentration de points noirs dans l'émulsion photographique au-dessus des noyaux radioactifs. Les noyaux marqués apparaissent en noir, et un grossissement suffisant permet de distinguer individuellement les points noirs caractéristiques du marquage.

Dans certains cas, et en particulier lorsque les noyaux sont eux-mêmes intensément colorés, ce marquage est peu évident au premier abord. Le cas particulier des mélanophores, cellules pigmentaires contenant de très nombreux granules de mélanine dans leur cytoplasme, nous a posé un problème que nous avons pu résoudre grâce à une méthode d'observation spécialement adaptée. Dans les conditions normales, il est, en effet, assez difficile de distinguer les granules de mélanine des grains d'argent caractéristiques du marquage : leurs dimensions sont très voisines, et leurs couleurs peu différentes.

La méthode d'observation utilisée met à profit la propriété que possèdent les grains d'argent contenus dans l'émulsion photographique de réfléchir la lumière incidente ; grâce à un double dispositif d'éclairage, qui éclaire simultanément la préparation autoradiographique par dessus et par dessous, et grâce aux objectifs Leitz « Ultropak », on peut observer la préparation en lumière incidente et en lumière transmise (Leitz Mitteilungen, 3, 1964). La coupe histologique conserve son aspect habituel et le pigment reste noir, tandis que les grains d'argent éclairés par dessus réfléchissent vivement la lumière incidente et apparaissent sous forme de points brillants, au lieu d'apparaître sous forme de points noirs comme dans les procédés habituels d'observation. La distinction des noyaux marqués lorsque ceux-ci sont intensément colorés, et l'étude des cellules pigmentaires, ont été grandement facilitées par cette technique particulière d'observation.

Ayant constaté, comme Tencer (1961), Quertier (1962) et nous-même que les embryons d'Amphibiens sont imperméables à la thymidine dans les conditions normales, Loeffler et Johnston (1964) ont montré que les solutions salines rendent les embryons perméables à la thymidine tritiée. Nous avons donc placé des œufs en segmentation dans la solution opératoire de Holtfreter additionnée de thymidine tritiée à raison de 5 à 8 µCi/ml, à des pH de 9 ou 7,5, pendant 1 à 3 jours ; nous avons effectivement constaté l'incorporation de la thymidine, mais le marquage nucléaire ainsi obtenu était beaucoup moins intense que celui que nous obtenons au moyen des injections de thymidine tritiée dans le blastocèle, et il aurait été absolument insuffisant pour marquer durablement les cellules de la crête neurale.

g) Culture d'explants.

Nous avons cultivé *in vitro* des fragments de crête neurale isolée, ou placée dans un « sandwich » d'ectoderme banal. Nous avons pour cela utilisé la méthode décrite par Obika (1963) ; chaque explant de

crête neurale est enveloppé dans un lambeau d'épiderme présomptif prélevé sur la même neurula et cultivé dans la solution opératoire de Holtfreter. Au bout de 24 heures, les explants ont pris une forme sphérique et, au cours des jours suivants, on voit les cellules pigmentaires apparaître sur la sphère.

Nous avons utilisé cette méthode d'explants pour observer l'apparition et la différenciation des cellules pigmentaires dans les différentes parties de la crête neurale.

3) Techniques histologiques.

Les embryons possédant encore du vitellus ont été fixés avec le liquide fixateur de Zenker ; les larves ne possédant plus de vitellus et les jeunes ont été fixés avec le liquide fixateur de Bouin-Hollande. Les inclusions ont été faites à la paraffine à 56°. Les coupes ont été pratiquées à l'épaisseur de 7,5 μ pour tous les animaux fixés avant le stade 54, et à l'épaisseur de 10 μ ou 15 μ pour les animaux plus âgés. La coloration la plus utilisée est la coloration par le glychémalun de Mayer-éosine.

La recherche des cellules chromaffines a été effectuée selon la méthode suivante : après anesthésie au MS 222 (Méthyl-sulfonate d'éthyl-ester benzoïque méta-aminé), les animaux sont incisés suivant la ligne médioventrale et les parois musculaires écartées : ils sont placés pendant 36 heures dans du liquide fixateur de Regaud, puis transférés, sans lavage, dans une solution de bichromate de potassium à 3 % pendant 5 jours. Après lavage à l'eau courante pendant 24 à 48 heures, les pièces sont placées dans des bains d'alcool éthylique à 75°, 90° et 100° pendant une heure, puis dans deux bains de benzène pendant deux heures, et enfin incluses dans la paraffine à 56°.

Les coupes sont faites à l'épaisseur de 10 ou 15 μ ; la seule coloration réalisée est la coloration des noyaux par le glychémalum de Mayer.

Pour observer avec plus de finesse les nerfs et les fibres nerveuses, et identifier les cellules de la gaine de Schwann qui leur sont associées, nous avons utilisé deux méthodes de coloration particulièrement adaptées aux cellules nerveuses, la méthode d'imprégnation argentique de Bodian, et la méthode de Mallory.

4) Subdivision de la crête neurale.

La neurula au stade 15 est sphérique et mesure 1,9 à 2,1 millimètres de diamètre. La largeur de la plaque médullaire dans la région antérieure est de 1,2 mm environ et dans la région postérieure de 0,5 mm environ. Les bourrelets médullaires eux-mêmes ont une largeur moyenne de 0,2 mm ; leur limite interne est soulignée par une bande brune.

La région céphalique est la région antérieure élargie, la région postérieure, dont la largeur est à peu près constante, est la région du tronc. Le premier point de soudure des bourrelets médullaires au stade 17 marque exactement la limite entre la région céphalique et la région troncale.

Préalablement à l'étude de la régionalisation de la crête neurale, il était nécessaire de définir un système de coordonnées permettant de définir avec précision chaque partie de la crête neurale.

Pour la crête neurale céphalique, nous avons choisi d'assimiler la plaque neurale à un cercle et la crête neurale à la circonférence qui le limite. Nous définirons chaque point de la crête neurale par la valeur de l'angle au centre formé par le rayon passant par ce point et le plan de symétrie bilatérale ; ainsi le point 0° est situé dans le plan de symétrie bilatérale, à la partie antérieure ; le point 90° est situé sur le rayon perpendiculaire au plan de symétrie bilatérale. La crête neurale est ainsi divisée en secteurs, définis par des valeurs d'angles : par exemple, le fragment 30-60° est compris entre les deux rayons faisant avec le plan de symétrie bilatérale des angles de 30° et de 60° : voir fig. 2, A.

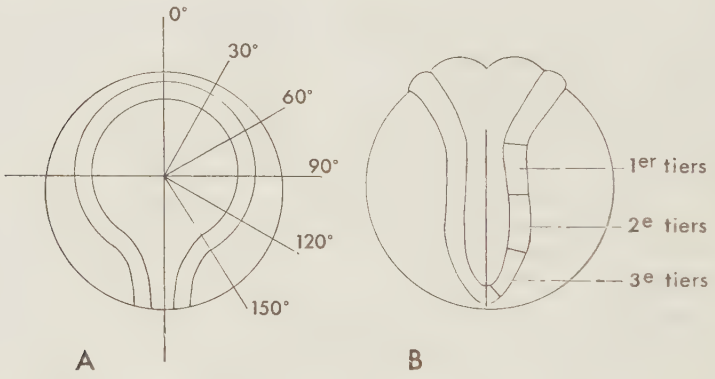

Fig. 2. — Subdivision de la crête neurale. A : Région céphalique : les segments successifs de la crête neurale sont désignés par la valeur de l'angle au centre formé par les rayons qui les limitent. B : Région troncale : les segments successifs sont désignés par leur longueur et leur position le long de la région troncale.

Pour la crête neurale troncale, qui est rectiligne, il nous suffit de noter la situation du point ou du fragment considéré entre les deux extrémités de la région troncale qui sont le début de la crête neurale céphalique (écartement des bourrelets) et le blastopore (fig. 2, B).

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES.

A. — MISE EN ÉVIDENCE DE LA MIGRATION PRÉCOCE DES CELLULES DE LA CRÊTE NEURALE.

La migration des cellules de la crête neurale peut être mise en évidence dès la fin du stade neurula par deux méthodes : la pose de marques colorées sur la crête neurale, suivie de l'observation directe, sur l'embryon, des plages colorées, et la greffe orthotopique de portions de crête neurale marquée, suivie de la fixation précoce des embryons et de l'autoradiographie des coupes pratiquées.

I) Marques colorées.

Des marques colorées ont été posées sur 25 neurulas au stade 14 ou 15 : il a été possible de poser 7 marques colorées alternativement rouges et bleues sur une même neurula ; mais, le plus souvent, on n'en a posé que 5 sur la région céphalique afin de laisser un petit intervalle entre elles, pour éviter le mélange partiel des colorants.

Dans les heures et les jours qui suivent la pose des marques colorées, on constate une légère diffusion du colorant, mais celle-ci reste négligeable devant l'évolution propre de chacune des marques : on voit se former de véritables traînées colorées sur la tête, jusqu'en des points très éloignés, suivant un tracé, qui, dans chaque cas, est caractéristique de la portion de crête neurale colorée.

Exemple 1 : Pose de marques colorées dans la région céphalique. Lorsque les marques colorées n'ont été posées que d'un seul côté, on remarque dans la moitié des cas environ l'apparition de traînées colorées du côté opposé, suivant le même dessin et le même horaire que du côté où les marques ont été posées. Exemple : Cas n° 11 et 12. 5 marques colorées posées aux points 0° - 45° - 90° - 120° - 150° (fig. 3).

L'évolution des plages colorées chez les deux embryons est tout-à-fait comparable : — au stade 22, la plage colorée n° 1 s'étend sur toute la partie antérieure et ventrale de la tête ; la plage colorée n° 2 s'étend jusqu'à l'ébauche de l'œil qu'elle recouvre ; la plage colorée n° 3 demeure moins étendue que les précédentes ; les marques 4 et 5 s'étalent largement en direction postérieure.

— au stade 24, les marques 1, 2 et 3 ont peu changé, mais on distingue maintenant dans le massif branchial de fines traînées colorées parfaitement nettes, et dont les couleurs sont différentes.

— au stade 28, les colorations deviennent plus pâles ; la plage n° 1 s'étend des narines externes à la bouche ; la plage n° 2 englobe largement l'œil ; la plage n° 3 s'est beaucoup étendue en direction postérieure ; la plage n° 4 produit 3 traînées colorées dans la partie antérieure du massif branchial, et la plage n° 5, 1 ou 2 traînées colorées dans la partie postérieure de celui-ci ; de plus, elle s'étire vers l'arrière jusqu'au dessus du pronéphros.

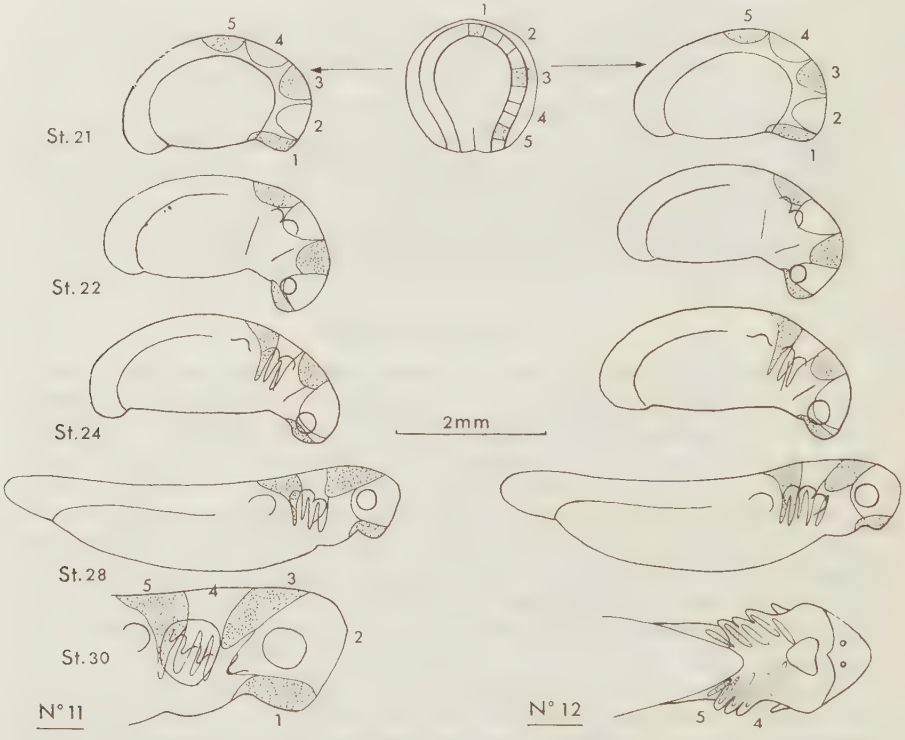

Fig. 3. — Evolution des marques colorées posées sur la crête neurale céphalique entre le stade neurula et le stade 30. La migration des cellules colorées suit un plan rigoureux, et colore d'une manière déterminée les différentes régions de la tête.

— enfin au stade 30, on remarque que la plage n° 2 s'étend jusqu'au balancier, tandis que les 4 traînées colorées situées dans le massif branchial sont encore bien distinctes.

Exemple 2 : Pose de marques colorées dans la région troncale. Cas H (fig. 4) 7 marques colorées ont été posées : 2 dans la région céphalique postérieure et 5 dans la région troncale.

On retrouve, pour les deux marques céphaliques, une évolution semblable à celle que nous avons décrite au paragraphe précédent. Pour les marques troncales, on ne voit pas se former de traînées

colorées comparables à celles de la tête ; on remarque seulement que toutes les marques s'allongent considérablement dans le sens antéro-postérieur, et que la plus postérieure colore presque toute la queue.

Les observations externes sont utilement complétées par la dissection des embryons : on peut alors voir dans quelles ébauches se trouvent les cellules colorées.

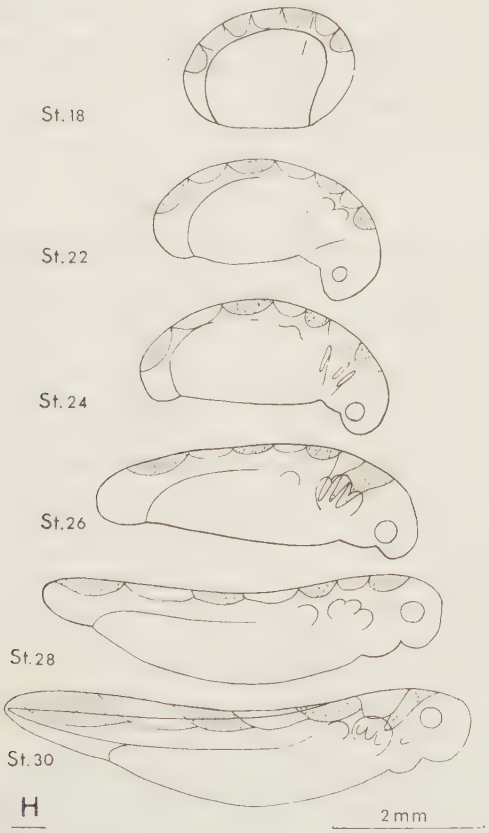

Fig. 4. — Evolution des marques colorées posées sur la crête neurale troncale. On remarque un allongement considérable de chacune des marques colorées : la dernière colore presque toute la queue.

Exemple 3 : cas G (fig. 5). 7 marques colorées avaient été posées au stade 18, dont 4 dans la région céphalique et 3 dans la région troncale. Leur évolution jusqu'au stade 26 est conforme aux observations précédentes, mais les marques 1 et 2, peu intenses, se sont déjà effacées. La marque 3 a donné naissance à une traînée colorée à la limite antérieure du massif branchial, la marque 4 à deux traî-

nées colorées dans le massif branchial, les marques 5, 6 et 7 n'ont produit aucune traînée colorée et se sont étirées dans le sens longitudinal.

La dissection de l'embryon à ce stade, révèle la présence dans la région postérieure, au niveau de la marque 7, d'une masse de cellules colorées dans l'épiderme dorsal, entre celui-ci et le tube nerveux, et à la partie dorsale du tube nerveux lui-même (coupe 1). Dans la région céphalique postérieure, au niveau de la marque 3, les cellules colorées sont situées entre l'encéphale et les capsules otiques (coupe 2). Enfin une coupe frontale (coupe 3) à travers le massif branchial montre de chaque côté un îlot parfaitement net intensément coloré en bleu, et, plus postérieurement, 2 îlots colorés en rouge. Ces îlots sont les futurs arcs branchiaux.

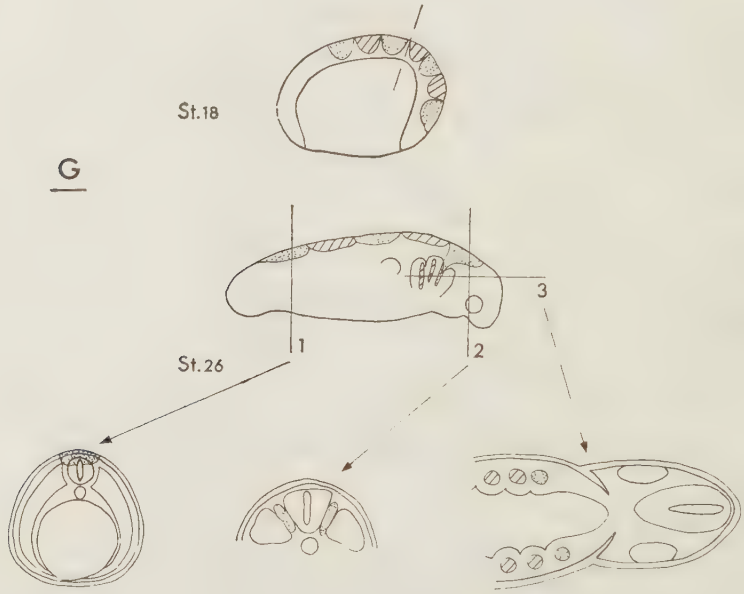

Fig. 5. — Coupes au stade 26 dans un embryon issu d'une neurula dont les crêtes neurales avaient été colorées : la coupe 1 dans la partie postérieure du tronc montre les cellules colorées dans l'épiderme dorsal, la partie dorsale du tube nerveux, et le mésenchyme avoisinant. La coupe 2 au niveau des capsules otiques montre les cellules marquées dans le mésenchyme entre le cerveau et les capsules otiques. La coupe 3, dans le plan frontal, montre au niveau des ébauches des arcs branchiaux une accumulation de cellules différemment colorées : 1 arc coloré par la marque 3, et les 2 suivants colorés par la marque 4.

La présence de régions colorées dans des territoires aussi nettement localisés montre bien qu'il s'agit, non d'une simple diffusion du colorant depuis la crête neurale, mais bien de la migration de cellules qui, initialement situées dans la crête neurale, se sont déplacées vers des régions précises et distinctes de l'embryon.

L'ensemble des observations faites après pose de marques colorées sur la crête neurale est résumé dans le tableau I.

TABLEAU I.

Régions de la crête neurale sur lesquelles ont été posées les marques colorees	Régions de la tête colorées au stade 30
0°-15°	région buccale - narines externes
45°	partie antérieure de la tête comprenant l'œil et le balancier
90°	balancier - otocyste - arcs viscéraux antérieurs
135°	arcs branchiaux

II) **Greffes orthotopiques de crête neurale marquée.**

Plusieurs dizaines d'opérations de ce type, unilatérales et bilatérales, ont été réalisées afin de suivre la migration précoce des cellules de la crête neurale.

Dans la région tronçale, les autoradiographies montrent que les cellules marquées constituent au stade 20 la partie dorsale de la moelle épinière et l'ectoderme dorsal (Pl. II, fig. 12) et que dès le stade 24 (bourgeon caudal), un certain nombre de cellules se sont éloignées du greffon : on les trouve principalement entre l'épiderme et les somites, et entre le tube nerveux et les somites ; il y a donc deux voies de migration simultanées. On en observe également à l'intérieur des massifs somitiques ; leur position tellement centrale indique que ces cellules marquées ne sont pas des cellules mésodermiques apportées avec le greffon : il s'agit bien de cellules de la crête neurale qui se sont insinuées au milieu des cellules somitiques.

Aux stades 24 et 25 (voir dessin des stades à la fig. 3), les cellules migratrices ne dépassent pas en direction ventrale le niveau de la chorde dorsale (Pl. II, fig. 13, 14, 15) ; au stade 28, elles atteignent la base des somites ; à partir du stade 30, elles atteignent les parois latérales du corps (Pl. II, fig. 16 et 17).

On observe les cellules marquées, non seulement en position ventrale par rapport au greffon, mais aussi en avant et en arrière de celui-ci : les cellules migratrices se déplacent dans toutes les directions de manière à coloniser toutes les régions qui avoisinent la greffe.

Cette observation permet de comprendre les mélanges de colorations que nous avons observés dans les cas où des marques colorées sont posées au contact les unes des autres ; elle permet également de comprendre les phénomènes de régulation sur lesquels nous aurons à plusieurs reprises l'occasion de revenir.

La migration peut être suivie de la même façon dans la région céphalique ; elle y présente les mêmes modalités. Par exemple, les cellules marquées se mettent en place autour du stomodeum dès le stade 26 (bourgeon caudal âgé) ; elles se différencient ensuite sur place.

Il est important de noter que lorsque la greffe est unilatérale on trouve des cellules marquées des deux côtés du tube nerveux ; au moment de la soudure des bourrelets médullaires, le greffon se trouve ramené dans le plan sagittal, et les cellules migratrices qui se détachent de lui peuvent s'engager d'un côté ou de l'autre du tube nerveux ; elles sont cependant plus nombreuses du côté du greffon. Cette observation est conforme à celle que nous avons faite précédemment à propos des marques colorées unilatérales, et permet également de comprendre certains aspects de ces phénomènes de régulation sur lesquels nous reviendrons.

La migration de certaines des cellules des crêtes neurales est donc extrêmement précoce ; elle est précédée d'un mélange partiel des cellules issues des deux crêtes neurales, qui peuvent migrer indifféremment d'un côté ou de l'autre. Cependant la plupart des cellules des crêtes neurales ne migrent pas et restent dans la région dorsale de l'embryon ; celles qui migrent se dispersent très vite et se divisent activement tout en restant indifférenciées. Seules, les méthodes de marquage permettent de les reconnaître et de les suivre.

B. — DÉRIVÉS DE LA CRÊTE NEURALE CÉPHALIQUE.

I. — Squelette crânien.

Landacre, le premier (1921) rapporte que, chez *Ambystoma*, les cartilages des arcs viscéraux sont formés de cellules issues de la crête neurale. Ses observations furent peu après confirmées par Stone (1926, 1929) chez *Ambystoma* et *Rana*, par Raven (1932) et de Beer (1947) chez *Ambystoma*.

Stone opérait en excisant différentes parties de la crête neurale au stade du bourgeon caudal, alors que les cellules de la crête neurale sont déjà en voie de migration. Raven pratique ses interventions au stade de la neurula, comme Hörstadius et Sellman (1946), dans leur étude de la détermination du chondrocrâne chez *Ambystoma*. Ces deux auteurs précisent la régionalisation de la crête neurale.

Dans le présent travail, nous avons toujours opéré sur la neurula, et nous avons élevé les animaux opérés jusqu'au stade 38 (prise de nourriture) : à ce stade en effet, le crâne de la larve est entièrement formé, et peut être étudié en détail sur coupes. Nous avons fait, d'après les coupes, 77 reconstitutions de crânes d'animaux opérés.

1) Le crâne des larves témoins au stade 38.

Un crâne de larve témoin au stade 38 est représenté par la fig. 6. Le neurocrâne est formé, à sa partie postérieure, de deux cartilages

parachordaux situés de part et d'autre de la partie antérieure de la chorde dorsale, de la plaque basale située en avant de la chorde dorsale, et portant de chaque côté les processus ascendants sur lesquels s'articulent les palato-carrés, et enfin des trabécules, qui s'étendent en avant jusqu'aux capsules olfactives.

Le splanchnocrâne, ou crâne viscéral, est formé de six arcs viscéraux et de deux basibranchiaux ou copulas : le premier arc est l'arc mandibulaire, formé ventralement par le cartilage de Meckel et dorsalement par les palato-carrés qui s'articulent sur le neurocrâne au niveau des processus ascendants. Le deuxième arc est l'arc hyoïde. Les quatre derniers arcs sont les arcs branchiaux : les arcs branchiaux 1 et 2 comportent un hypobranchial et un cératobranchial ; les arcs branchiaux 3 et 4 ne comportent qu'un cératobranchial. Les deux hypobranchiaux sont soudés au 1er basibranchial situé en avant, et au 2e basibranchial dirigé vers l'arrière.

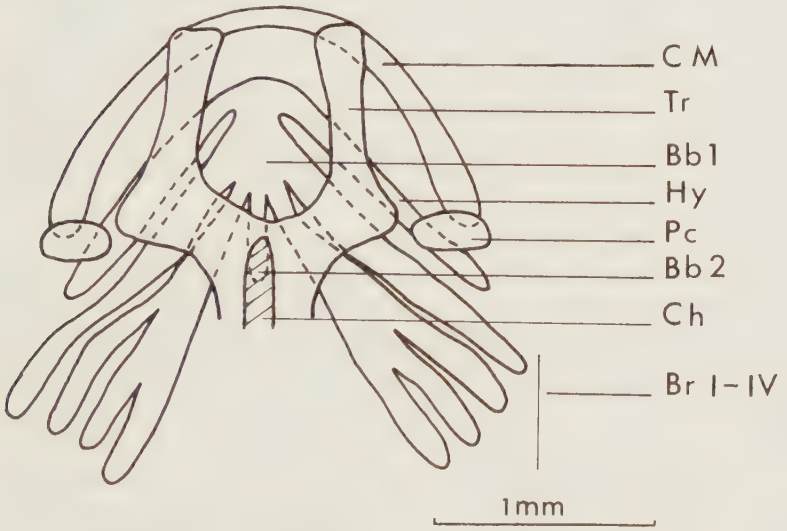

Fig. 6. — Squelette crânien d'une larve témoin au stade 38.
Bb 1 : basibranchial 1 ; Bb 2 : basibranchial 2 ; Br I-IV : arcs branchiaux I à IV ; Ch : chorde dorsale ; CM : cartilage de Meckel ; Hy : arc hyoïde ; Pc : palato-carré ; Tr : trabécule.

2) Expériences d'ablations de la crête neurale.

a) *Ablations totales bilatérales :* (25 cas).

L'opération entraîne l'enroulement prématuré de la plaque médullaire et par suite le maintien d'une large plaie ouverte sur toute la région céphalique. La cicatrisation ne se fait pas, et les embryons se cytolysent au bout de deux ou trois jours. En appliquant sur la plaque médullaire aussitôt après l'ablation un fragment de lamelle couvre-objet, la plaque médullaire ne se roule pas, mais la cicatrisation ne se réalise tout de même pas dans de bonnes conditions :

les embryons présentent une nécrose au moins partielle de la tête, et dans ces conditions, il n'était pas possible de tenir compte de ces larves.

b) *Ablations totales unilatérales.*

Si l'ablation totale de la crête neurale n'est réalisée que d'un seul côté, la cicatrisation s'effectue dans de bonnes conditions : 7 cas ont été opérés de cette manière. L'aspect extérieur de ces larves est normal, à l'exception d'une légère dissymétrie de la tête.

Cas moyen : D 2. L'aspect externe de la tête est normal. Les coupes montrent une légère réduction de taille de la narine externe, de l'œil et de l'hémisphère cérébral situés du côté opéré. Mais le squelette du crâne est complet et normal. Les ganglions crâniens sont normaux.

Une seule crête neurale peut donc suffire à édifier un crâne complet ; toutes les pièces squelettiques situées du côté opéré dérivent de la crête neurale du côté opposé dont les cellules migratrices se sont donc réparties également entre les deux côtés de l'embryon.

De nombreuses expériences d'ablations localisées de la crête neurale d'un seul côté ont été réalisées. Toutes sont suivies de l'édification d'un crâne complet et normal. Pour connaître le point d'origine des cellules constituant chaque partie du crâne, il était donc nécessaire de pratiquer des ablations localisées, mais bilatérales.

c) *Ablations bilatérales localisées :*

Au-dessus d'une largeur correspondant à un arc de 30°, toute ablation bilatérale entraîne des déficiences squelettiques ; jusqu'à une largeur maximum de 30°, les ablations bilatérales n'entraînent aucune modification squelettique, sauf dans les régions antérieure et postérieure qui se révèlent plus sensibles. Sur les 45 cas opératoires de ce type, seules les ablations bilatérales 0-30° et 120-150° entraînent des modifications de l'aspect extérieur de la tête, et du squelette.

— Ablations bilatérales 0-30° (13 cas) ; elles entraînent un raccourcissement de la tête avec déplacement des yeux vers l'avant (Pl. I, fig. 7 et 9) et la fusion des extrémités antérieures des trabécules.

— Ablations bilatérales 120-150° (12 cas) : réduction de taille des filaments branchiaux externes et modifications importantes, d'ailleurs dissymétriques, des arcs branchiaux (Pl. I, fig. 8).

Dans tous les autres cas, l'opération ne produit aucune modification du crâne. Les ablations étant bilatérales, cette régulation ne peut résulter que de l'intervention de cellules issues des segments antérieur et postérieur de la crête neurale.

– Ablations 0-45° (5 cas) : elles provoquent le raccourcissement de la tête, le rapprochement et parfois la fusion des yeux (1 cas : individu cyclope). Les trabécules sont fusionnés en avant et raccourcis, le reste du crâne est normal (fig. 7, A).

— Ablations 45-90° (6 cas) : modifications de la région buccale. Dans 3 cas, la bouche restait béante et non fonctionnelle ; les trabécules sont normaux, mais le cartilage de Meckel est plus ou moins profondément modifié (fig. 7, B).

— Ablations 90-135° (6 cas) : la tête des larves opérées est bosselée et plus étroite dans sa partie postérieure ; les filaments branchiaux externes sont réduits ou même totalement absents. Les trabécules et le cartilage de Meckel sont normaux mais l'arc hyoïde manque entièrement ; le premier arc branchial est représenté par son seul hypobranchial. Les arcs branchiaux 2, 3 et 4 sont plus ou moins réduits (fig. 7, C).

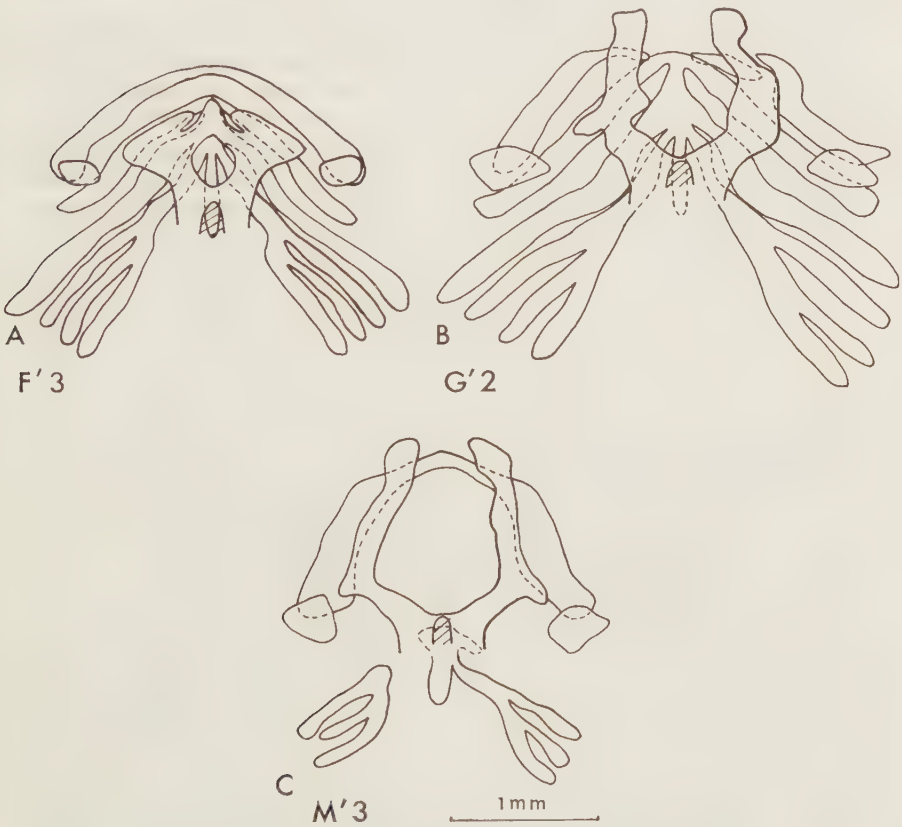

Fig. 7. — A : squelette crânien de la larve F'3 (ablation bilatérale des crêtes neurales céphaliques 0-45°) : trabécules fusionnés dans le plan médian et très raccourcis.

B : larve G'2 (ablation bilatérale des crêtes neurales céphaliques 45-90°) : trabécules peu modifiés ; cartilage de Meckel incomplet, fragmenté en trois parties.

C : larve M'3 (ablation bilatérale des crêtes neurales céphaliques 90-135°) : arc hyoïde et premier arc branchial totalement absents ; toutefois une partie de l'hypobranchial 1 est présente à droite ; les deux hypobranchiaux sont absents à gauche.

— Ablations 0-60° (6 cas) : on observe le rapprochement ou la fusion des yeux sur l'avant de la tête. Les trabécules sont fusionnés en avant, dans 3 cas sur 6, mais le cartilage de Meckel et tout le reste du crâne sont normaux.

— Ablations 0-90° (4 cas) : elles produisent le rapprochement ou la fusion des yeux sur l'avant de la tête et l'absence de narines externes. Les trabécules sont fusionnés en avant et raccourcis, le cartilage de Meckel est fortement aminci ou raccourci, et l'arc hyoïde légèrement raccourci.

— Ablations 45-135° (12 cas) : de graves modifications de la tête s'observent : la tête est bosselée, la bouche est déformée et béante, les filaments branchiaux sont réduits dans 2 cas sur 12.

Exceptionnellement les embryons de cette série ont été mis en parabiose avec des larves normales, ce qui a permis à 4 d'entre elles d'arriver presque jusqu'à la métamorphose (stade 54), alors qu'elles ne pouvaient s'alimenter par elles-mêmes. Elles ont alors été fixées, et leurs tissus ont été éclaircis. Les éclaircissements montrent que les trabécules sont normaux mais que le splanchnocrâne est bouleversé ; le cartilage de Meckel, l'arc hyoïde et le basibranchial 1 sont particulièrement atteints (fig. 8).

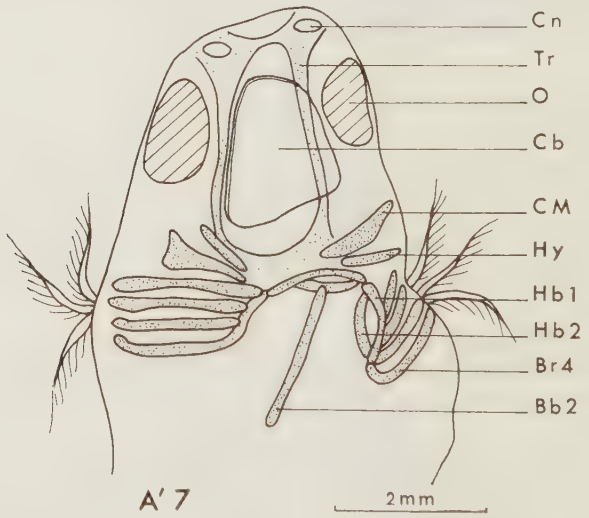

Fig. 8. — Squelette crânien de la larve A'7 (ablation bilatérale des crêtes neurales céphaliques 45-135°) parvenue au stade 54 grâce à sa mise en parabiose : l'ensemble du splanchnocrâne est déformé ; le cartilage de Meckel et l'arc hyoïde sont incomplets. Le basibranchial 1 est absent. Les arcs branchiaux, surtout du côté gauche de l'animal, sont gravement déformés. Bb 2 : basibranchial 2 ; Br 4 : arc branchial 4 ; C b : cavité buccale ; C M cartilage de Meckel ; C n : capsule nasale ; Hb 1 : hypobranchial 1 ; H b 2 : hypobranchial 2 ; H y : arc hyoïde ; O : œil ; Tr : trabécule.

L'ensemble de ces résultats montre que les ablations bilatérales de la crête neurale entraînent des déficiences du crâne ; la nature et l'ampleur de ces déficiences dépendent de la position et de la

largeur du fragment de crête neurale excisé ; à chaque pièce squelettique nous pouvons assigner une origine précise dans la crête neurale. Le Tableau II résume ces résultats.

TABLEAU II.

Pièces squelettiques crâniennes	Segment de crête neurale correspondant	Position moyenne de ce segment
Partie antérieure des trabécules	30°-60°	45°
Cartilage de Meckel	60°-90°	75°
Arc hyoïde	60°-135°	100°
Hypobranchiaux 1 et 2 Basibranchial 1 Arc branchial 1	90°-135°	110°
Arcs branchiaux 2, 3 et 4	135°-150°	140°

On remarque que la partie postérieure des trabécules, la plaque basale et le basibranchial 2 ne sont jamais affectés par les ablations de crête neurale ; ils sont présents dans tous les cas. Nous retrouvons ici les résultats de Hörstadius et Sellman, Stone et Landacre.

3) Greffes hétérotopiques.

Nous avons implanté à la place de la crête neurale céphalique, soit des fragments de la crête neurale céphalique provenant d'autres régions de la tête, soit des fragments de crête neurale troncale, soit enfin des lambeaux d'ectoderme banal.

a) *Greffe de fragments hétérotopiques de crête neurale céphalique :*

8 opérations unilatérales de ce type ont été réalisées : la greffe unilatérale de crête neurale céphalique hétérotopique n'entraîne pas de modification notable du crâne. Mais il n'est pas possible de savoir si ce résultat est obtenu par la participation de la crête hétérotopique greffée à l'édification du crâne, ou par l'intervention des phénomènes de régulation dont nous avons déjà vu l'importance. Cette question sera reprise plus loin, avec l'aide de la méthode de marquage nucléaire de la crête neurale.

b) *Greffe de crête neurale troncale en position céphalique :*

On substitue à la crête neurale céphalique des fragments de crête neurale troncale : 40 opérations de ce type ont été réalisées.

— *Substitution totale unilatérale* : la totalité de la crête neurale céphalique d'un seul côté n'a pu être excisée et remplacée avec succès par de la crête neurale troncale que trois fois seulement : il est en effet difficile d'implanter un long fragment de crête troncale, qui

est rectiligne, à la place de la crête céphalique, qui est courbe : le maintien en place du greffon est extrêmement délicat. Sur ces trois cas, l'un montre un crâne normal, et les deux autres quelques malformations : dans 1 cas, le trabécule du côté opéré est plus court que l'autre, l'arc hyoïde présente une interruption, et les 2 hypobranchiaux sont tordus ; dans l'autre cas, le trabécule du côté opéré est également plus court, et le cartilage de Meckel présente une interruption ; l'ensemble du splanchnocrâne est un peu plus petit du côté opéré.

— *Substitution de crête neurale troncale à la partie céphalique 30-150° : opérations unilatérales.* 9 opérations de ce type ont été réalisées. Elles montrent des modifications sensibles du crâne qui se situent suivant les cas à des niveaux différents : 1 cas ne montre de modifications que sur le trabécule et le cartilage de Meckel, qui sont plus petits du côté opéré ; 1 autre cas montre le raccourcissement du trabécule et du cartilage de Meckel du côté opéré, mais aussi la réduction des 4 arcs branchiaux du côté opposé. Un cas moyen montre une réduction sévère du cartilage de Meckel, de l'arc hyoïde et du premier arc branchial du côté opéré.

— *Substitution de crête neurale troncale à la partie céphalique 0-90°* (7 opérations unilatérales et 8 bilatérales). Les opérations unilatérales montrent des modifications du crâne toujours légères n'affectant que le trabécule ou le cartilage de Meckel du côté opéré.

Les opérations bilatérales ont entraîné des modifications beaucoup plus profondes de l'aspect extérieur de la tête qui, dans 6 cas sur 8, ne présentait qu'une seule narine externe médiane, et dont les yeux étaient rapprochés ou même (5 cas) soudés sur l'avant de la tête. La région antérieure du crâne est profondément modifiée. Dans tous les cas, les trabécules sont raccourcis, et dans 6 cas, ils sont fusionnés à leur partie antérieure. Le cartilage de Meckel est, soit aminci, soit plus court d'un côté (fig. 9, A).

— *Substitution de crête neurale troncale à la partie céphalique 90-150°* (9 cas). 3 opérations unilatérales n'ont produit aucune modification des trabécules ni du cartilage de Meckel. L'arc hyoïde est extrêmement réduit (1 cas) ou totalement absent (2 cas) du côté opéré et les 4 arcs branchiaux sont diversement modifiés et réduits. L'ensemble du splanchnocrâne est dissymétrique, et tordu (fig. 9, B).

6 opérations bilatérales ont entraîné de graves déficiences dans la partie postérieure du splanchnocrâne ; l'arc hyoïde et les 4 arcs branchiaux sont extrêmement réduits et, le plus souvent, ils sont totalement absents (fig. 9, C).

Toutes ces opérations de greffe hétérotopique de crête neurale troncale dans la région céphalique montrent donc des malformations du crâne variées, mais toujours nettes. Les opérations unilatérales entraînent des modifications du crâne alors que, nous l'avons vu, les ablations de la crête neurale céphalique n'en produisent pas. Les opérations bilatérales entraînent toujours des modifications extrêmement profondes.

Nous ferons à ce propos deux remarques : 1) nous retrouvons, dans cette série d'expériences, les localisations de la crête neurale céphalique que nous avons dégagées au chapitre précédent ; 2) les modifications du crâne entraînées par ces opérations hétérotopiques sont au moins aussi graves que les ablations simples pour les opérations bilatérales, et plus importantes pour les opérations unilatérales.

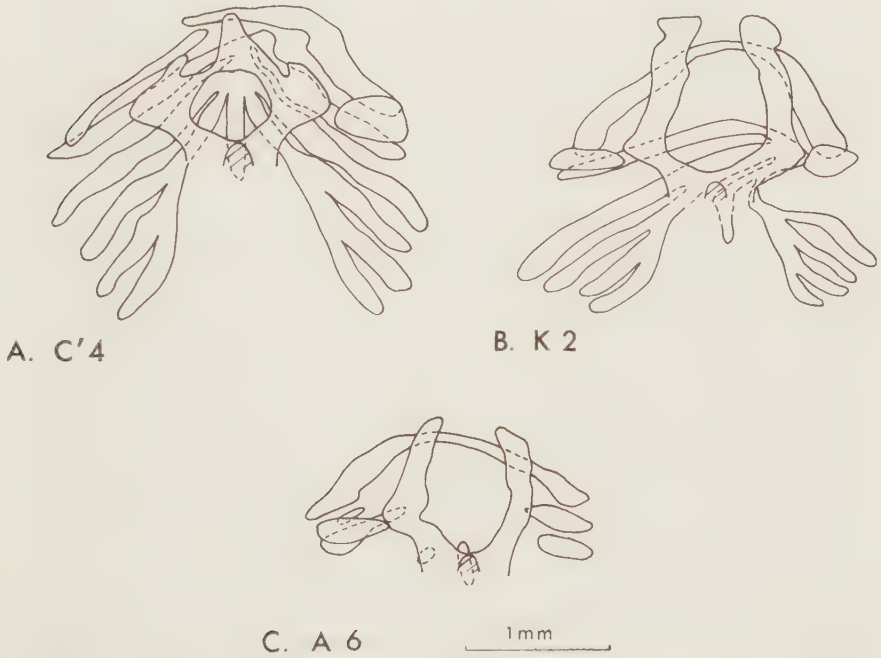

Fig. 9. — A : squelette crânien de la larve C'4 (greffe hétérotopique bilatérale de crête troncale à la place des crêtes céphaliques 0-90°) : extrémités antérieures des trabécules fusionnées sur une grande longueur ; cartilage de Meckel interrompu ; le palato-carré manque du côté gauche ; l'arc hyoïde est légèrement déformé. B : larve K 2 (greffe hétérotopique unilatérale de crête troncale à la place de la crête céphalique 90-150°) : du côté opéré l'arc hyoïde et l'hypobranchial 1 manquent ; les 4 arcs branchiaux sont plus petits du côté opéré ; le splanchnocrâne dans son ensemble est déporté vers le côté opéré. C : larve A 6 (greffe hétérotopique bilatérale de crête troncale à la place de la crête céphalique 90-150°) : on reconnait de part et d'autre des trabécules les palato-carrés et des nodules cartilagineux qui représentent vraisemblablement l'arc hyoïde et le 1er arc branchial. Sous la plaque basale, le basibranchial 2, et, à gauche, un petit nodule cartilagineux, seul vestige de l'un des arcs branchiaux.

Nous pouvons donc conclure que la crête neurale troncale, implantée au stade neurula à la place de la crête neurale céphalique, n'est pas capable de produire de cartilages squelettiques. De plus, les opérations unilatérales montrent même que sa seule présence diminue le pouvoir de régulation de la crête céphalique demeurée en place.

c) *Greffe de lambeaux d'ectoderme à la place de la crête neurale céphalique :*

L'ectoderme banal prélevé dans la région ventrale ou latérale de la neurula peut-il remplacer la crête neurale céphalique pour l'édification du crâne ?

Nous avons excisé diverses parties de la crête céphalique et implanté à leur place des lambeaux d'ectoderme banal (7 cas d'opérations unilatérales). Ces opérations ne produisent, sauf dans 1 cas, que des modifications très légères du squelette crânien. La présence d'un lambeau d'ectoderme ne constitue donc pas un empêchement à la migration des cellules qui, issues de la crête neurale du côté opposé, viennent coloniser le côté opéré. L'ectoderme banal ne se comporte pas, à cet égard, comme la crête neurale troncale qui, dans les mêmes conditions, entrave partiellement la migration de ces cellules.

En résumé, cette méthode d'étude au moyen des ablations et des greffes hétérotopiques nous a permis de montrer que la crête neurale est à l'origine du squelette crânien, à l'exception de la partie postérieure des trabécules, de la plaque basale, et du basibranchial 2. Elle a permis de montrer également que la crête neurale céphalique est régionalisée, mais aussi qu'il existe de larges possibilités de régulation. Chaque partie de la crête neurale est déjà déterminée au stade 15, mais cette détermination est encore labile puisque, en cas d'ablation bilatérale d'une partie de la crête neurale, la régulation peut s'effectuer à condition que la partie enlevée ne dépasse pas 30° de longueur. La régulation implique un changement des potentialités morphogénétiques des cellules de la crête neurale situées au voisinage du segment enlevé.

La migration des cellules de la crête neurale d'un côté à l'autre de l'embryon, très importante après les ablations unilatérales de crête neurale, ou après remplacement de celle-ci par de l'ectoderme banal, est rendue difficile par la présence de crête neurale troncale. La crête neurale troncale ne peut, en aucun cas, remplacer la crête neurale céphalique dans l'édification du crâne.

Les phénomènes de régulation limitent la précision que l'on peut obtenir en utilisant ces méthodes opératoires. En effet, les ablations fines de courts segments de la crête neurale, qui auraient pu permettre d'établir une régionalisation précise, sont en réalité suivies d'une régulation totale qui efface complètement les effets de l'opération. Grâce au marquage nucléaire de la crête neurale par la thymidine tritiée, nous avons pu obtenir beaucoup de précision dans nos résultats.

4) Expériences avec marquage nucléaire de la crête neurale par la thymidine tritiée.

a) *Greffes orthotopiques de crête neurale marquée :*

40 opérations de ce type ont été réalisées qui intéressent toutes les parties de la crête neurale céphalique. Dans tous les cas, on obtient des crânes normaux et complets.

Nous avons procédé par greffe de segments successifs de crête neurale marquée, unilatérale ou bilatérale.

— Greffes orthotopiques 0-30°. En aucun cas, les cartilages du crâne ne sont marqués, mais l'encéphale antérieur est marqué (cf. page 63). Dans 4 cas, les trabécules sont fusionnés en avant.

— Greffes orthotopiques 0-45°. Opérations unilatérales (fig. 10, A). Le crâne est normal, mais le trabécule situé du côté opéré est entièrement marqué.

Greffes orthotopiques 0-90°. Opérations unilatérales (fig. 10, B et Pl. III, fig. 24 et 25). Le crâne est normal ; le trabécule du côté opéré est entièrement marqué, y compris sa partie postérieure ; la plaque basale et le cartilage parachordal sont également marqués ; l'extrémité de la branche gauche du cartilage de Meckel et le palato-carré sont marqués. On constate un marquage très net, bien que moins intense, dans le trabécule droit.

— Greffes orthotopiques 90-150° (fig. 10, C). Opérations unilatérales. La partie postérieure du cartilage de Meckel est marquée, mais pas le palato-carré ; l'arc hyoïde, les deux hypobranchiaux et les 4 arcs branchiaux sont marqués ; le basibranchial 2 n'est pas marqué. Du côté opposé, on trouve des cellules marquées dans la région postérieure des arcs branchiaux 1 et 2.

— Greffes orthotopiques 120-150°. Opérations unilatérales (fig. 10, D et Pl. III, fig. 27). L'hypobranchial 1 et les arcs branchiaux 1, 2 et 3 sont entièrement marqués, sauf la partie tout-à-fait postérieure de l'arc branchial 3. L'hypobranchial 2, le basibranchial 2 et l'arc branchial 4 ne sont pas marqués.

— Greffes orthotopiques 140°-début tronc. Opérations unilatérales (fig. 10, E). Seules les extrémités postérieures des arcs branchiaux 3 et 4 sont marquées.

On voit d'après ces exemples que les parties marquées du crâne dépendent étroitement de l'emplacement qui a été opéré : à chaque région de la crête neurale, correspondent rigoureusement des parties déterminées du crâne.

L'ensemble de ces résultats est résumé dans le Tableau III.

TABLEAU III.

Régions de la crête neurale	Pièces squelettiques crâniennes
0°-30°	Aucune pièce squelettique
30°-50°	Partie antérieure des trabécules
50°-70°	Partie postérieure des trabécules Plaque basale Palato-carré
70°-100°	Cartilage de Meckel Arc hyoïde
100°-120°	Basibranchial 1 Hypobranchiaux Arcs branchiaux antérieurs
128°-150°	Arcs branchiaux postérieurs

Nous retrouvons dans ce tableau les résultats déjà obtenus par la méthode des ablations (Tableau II), mais les localisations que nous indiquons ici diffèrent légèrement de celles que nous avons données précédemment. En effet, la méthode de marquage nucléaire apporte des résultats plus précis. Une greffe étroite nous renseigne exactement sur les potentialités d'un court segment de la crête neurale, alors que l'ablation de ce même segment reste sans effet, par suite des phénomènes de régulation. Nous obtenons ainsi des résultats plus rigoureux, puisqu'en aucune de ses parties, la crête neurale ne subit, du fait de l'opération, aucun changement de ses potentialités.

Nous pouvons donc présenter ici une régionalisation plus précise : à chaque pièce squelettique, nous assignons pour origine une région de la crête neurale plus courte que précédemment (fig. 10, F).

Cependant, un certain chevauchement de ces segments successifs reste manifeste. De légères différences entre plusieurs cas d'opérations semblables montrent que les limites de chacune des régions que nous avons définies ne sont pas tranchées, et qu'il existe un passage progressif de l'une à l'autre. C'est ainsi que, dans les cas où l'opération porte sur une partie seulement du segment de crête neurale qui est à l'origine, par exemple, de l'arc hyoïde, celui-ci peut être ou ne pas être marqué.

On remarque que, dans la moitié environ des cas d'opérations unilatérales, des cellules marquées sont présentes du côté opposé à l'opération. Elles mettent ainsi de nouveau en évidence le mélange des cellules des crêtes neurales droite et gauche au moment de la fermeture du tube nerveux.

Dans le cas de la plaque basale et des cartilages parachordaux, une différence notable existe entre ces résultats et ceux que nous avons obtenus par la méthode des ablations. D'après cette méthode, la plaque basale et les cartilages parachordaux ne peuvent dériver de

---

Légende de la Fig. 10.

Fig. 10. — A : squelette crânien de la larve Th 19.6 (greffe orthotopique unilatérale de crête neurale marquée en 0-45°) : partie antérieure du trabécule droit entièrement marquée. B : larve Th 18.1 (greffe orthotopique unilatérale de crête neurale marquée en 0-90°) : trabécule entier du côté opéré, plaque basale, cartilage parachordal, palato-carré, et extrémité de la branche gauche du cartilage de Meckel sont marqués. La région antérieure du trabécule droit est légèrement marquée. C : larve Th 18.2 (greffe orthotopique unilatérale de crête neurale marquée en 90-150°) : la partie tout à fait postérieure du cartilage de Meckel, l'arc hyoïde, et les 4 arcs branchiaux du côté opéré sont marqués. Du côté opposé, des cellules marquées s'observent dans les arcs branchiaux 1 et 2. D : larve Th 22.1 (greffe orthotopique unilatérale de crête neurale marquée en 120-150°) : l'arc branchial 1 est entièrement marqué ; l'hypobranchial 2 n'est pas marqué, mais les arcs branchiaux 2 et 3 sont marqués, à l'exception de l'extrémité de l'arc 3. E : larve Th 18.3 (greffe orthotopique unilatérale de crête neurale marquée en 140°-début tronc) : seules les extrémités postérieures des arcs branchiaux 3 et 4 sont marquées. F : schéma récapitulatif des subdivisions de la crête neurale céphalique, et des dérivés squelettiques correspondants. (Voir légende à la figure 6).

la crête neurale, pas plus que le basibranchial 2, puisqu'ils sont toujours présents quelles que soient les ablations de crête neurale réalisées. Hörstadius et Sellman pensent que ces pièces sont d'origine endomésodermique.

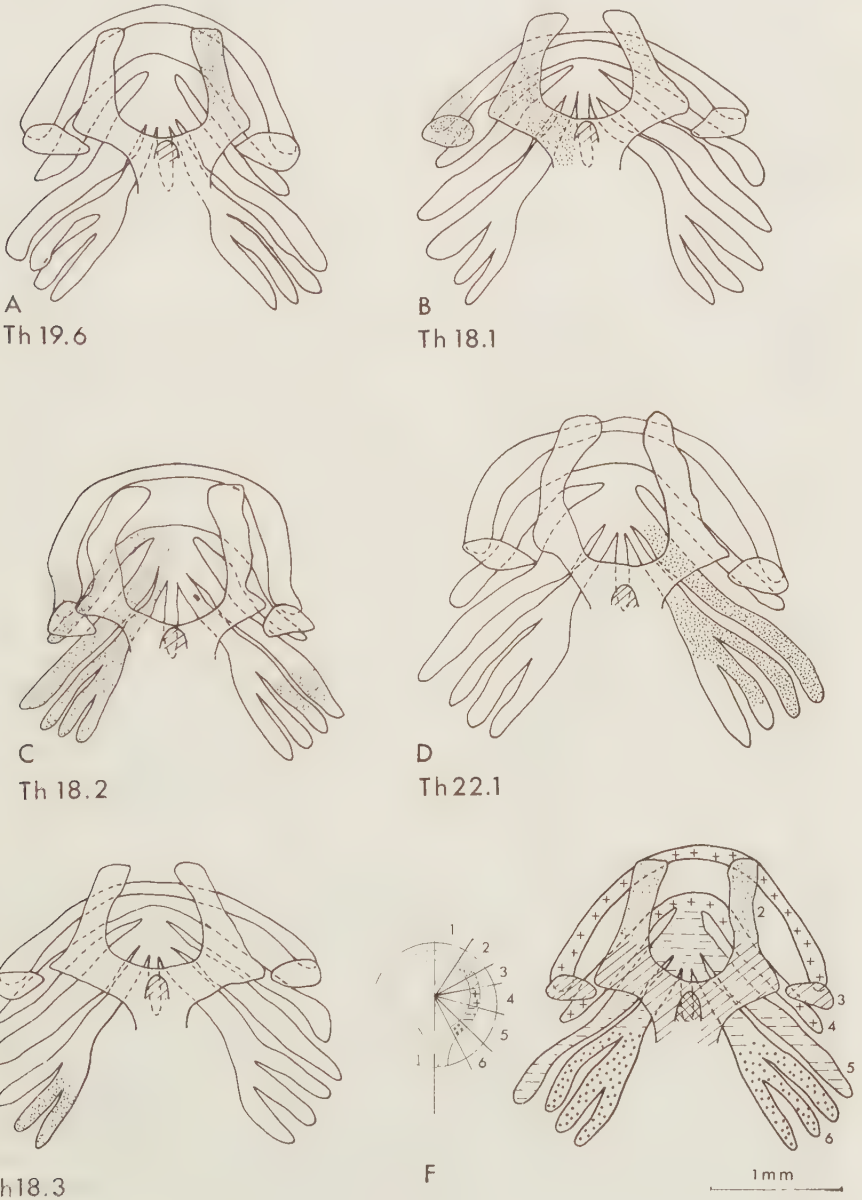

Fig. 10.

Mais le marquage nucléaire de la crête neurale montre que la plaque basale et les parachordaux sont marqués lorsque les opérations portent sur la région 50-70° ; il faut donc considérer que la crête neurale participe à la formation de ces pièces concurremment avec un tissu qui pourrait être l'endomésoderme. Le rôle de cet endomésoderme est assez important pour que ces pièces se forment même en l'absence de toute participation de la crête neurale, mais la participation de celle-ci à leur formation, dans les conditions normales, est attestée par la présence en elles de cellules marquées issues de la crête neurale. Le marquage nucléaire met en évidence cette participation qui, avec les autres méthodes d'investigation, était restée inaperçue.

Par contre, en aucun cas, le basibranchial 2 ne comporte de cellules marquées. Il est donc bien totalement indépendant de la crête neurale.

b) *Greffes hétérotopiques de crête neurale marquée :*

Nous avons, dans ces expériences, remplacé des parties définies de la crête neurale céphalique par d'autres parties de la crête céphalique, ou par des fragments de la crête neurale troncale.

— *Greffons hétérotopiques céphaliques* (8 cas). Dans tous ces cas, les crânes sont normaux et bien développés ; 2 cas seulement montrent la fusion des extrémités antérieures des trabécules.

Dans 5 cas, aucune partie du crâne n'est marquée : le greffon n'a donc aucunement participé à son édification. Mais 3 cas montrent des cellules marquées dans certaines parties du crâne.

Exemple : cas Th 22-5 (fig. 11, A). Un greffon 90-120° a été implanté dans la région 0-45°. Des cellules marquées s'observent dans le trabécule et la moitié du cartilage de Meckel situés du côté opéré : la crête neurale implantée à donc participé à leur formation. Or dans les conditions normales, un greffon 90-120° donne naissance à l'arc hyoïde, aux hypobranchiaux et aux arcs branchiaux antérieurs ; dans ce cas, il a donné naissance à des cellules situées dans le trabécule et le cartilage de Meckel.

Par ailleurs, le trabécule est normalement issu de la région 30-50°, et le cartilage de Meckel de la région 70-100° : nous constatons que les régions du crâne dérivées de cette crête neurale hétérotopique ne correspondent pas non plus entièrement aux potentialités de la région où le greffon a été implanté.

Le greffon a subi un changement de ses potentialités : les cellules qui en sont issues ont colonisé des régions différentes de celles qu'elles colonisent normalement, et qui sont aussi en partie différentes de celles que colonise la région de la crête neurale qui a été remplacée par le greffon. Les cellules issues de la crête neurale greffée s'observent finalement à des emplacements qui ne correspondent exactement, ni à leurs potentialités normales, ni aux potentialités normales de celles qu'elles ont remplacé.

En résumé, les fragments hétérotopiques de crête neurale céphalique ne participent à la construction du crâne que dans la moitié des cas environ, et d'une manière qui manifeste que celle-ci est encore capable de subir un changement de ses potentialités : elle n'est pas irrévocablement déterminée. Dans les autres cas, la crête neurale céphalique hétérotopique ne participe pas à l'édification du

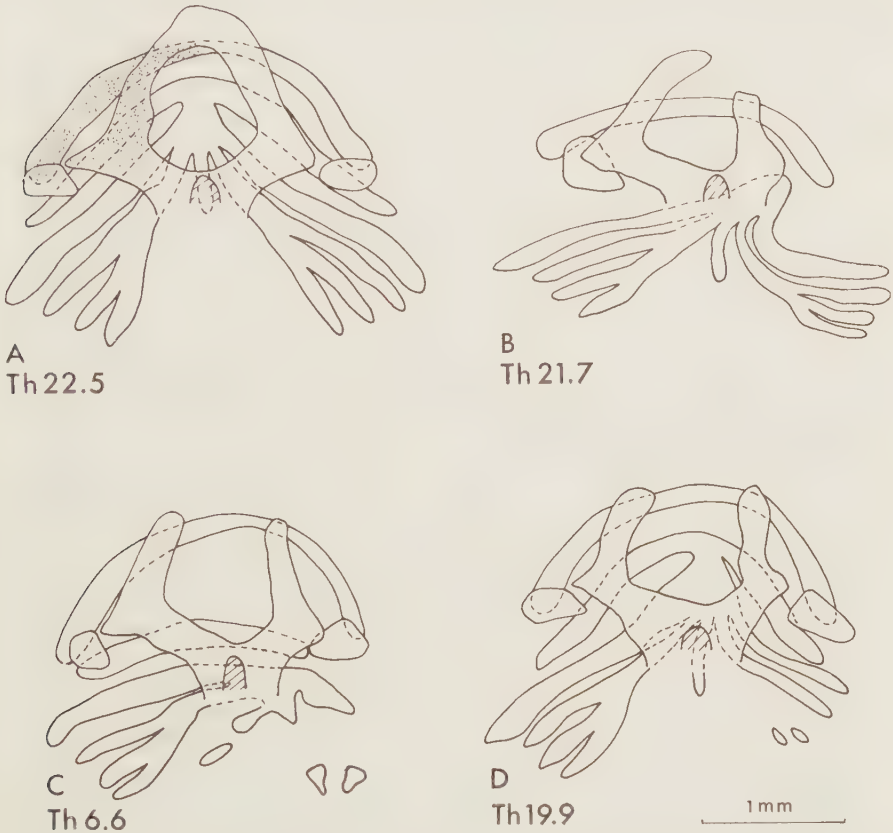

Fig. 11. — A : squelette crânien de la larve Th 22.5 (greffe hétérotopique unilatérale de crête céphalique 90-120° marquée en 0-45°) : trabécule gauche et moitié gauche du cartilage de Meckel marqués. B : larve Th 21.7 (greffe hétérotopique unilatérale de crête troncale marquée à la place de la crête céphalique 0-120°) : aucune partie du crâne n'est marquée. Du côté opéré le trabécule est raccourci ; le cartilage de Meckel est déformé et raccourci ; le palato-carré est absent. L'arc hyoïde manque entièrement ; les 4 arcs branchiaux sont déformés et plus petits du côté opéré. C : Th 6.6 (greffe hétérotopique unilatérale de crête troncale marquée à la place de la crête céphalique 90-150°) : l'arc hyoïde n'est pas soudé au basibranchial 1, et il est plus court du côté opéré ; les 4 arcs branchiaux ne sont représentés que par la base des hypobranchiaux 1 et 2 et deux nodules cartilagineux isolés. Aucune partie du crâne n'est marquée. D : larve Th 19.9. (greffe hétérotopique unilatérale de crête troncale marquée à la place de la crête céphalique 120-150°) : seuls les arcs branchiaux sont affectés : arcs 1 et 2 plus minces du côté opéré, arcs 3 et 4 représentés par deux petits nodules isolés. Aucune partie du crâne n'est marquée.

crâne, et celui-ci est normalement constitué grâce aux phénomènes de régulation qui se produisent à partir des segments de la crête neurale laissés en place.

Sans le marquage de la crête neurale greffée, nous n'aurions pu savoir si la constitution normale du crâne après une telle opération était due à la participation du greffon dans la formation du crâne, ou à des phénomènes de régulation. Grâce au marquage, nous pouvons affirmer que dans 5 cas sur 8 le greffon n'a aucunement participé à la formation du crâne, et que dans 3 cas il y a participé.

— *Greffons troncaux* : 33 opérations de ce type ont été réalisées, portant sur toutes les parties de la crête neurale céphalique.

Exemples :

— cas Th 21-7 (fig. 11, B). Greffe unilatérale en 0-120° de crête neurale troncale. Du côté opéré le trabécule est plus court, le cartilage de Meckel est déformé, le palato-carré et l'arc hyoïde sont absents, et les 4 arcs branchiaux sont très déformés. Aucune partie du crâne n'est marquée.

— cas Th 6-6 (fig. 11, C). Greffe unilatérale en 90-150° de crête neurale troncale. L'arc hyoïde est plus court du côté opéré. Les hypobranchiaux sont difficiles à identifier avec certitude, les 4 arcs branchiaux sont réduits à deux petits nodules cartilagineux. Aucune partie du crâne n'est marquée.

— cas Th 19-9 (fig. 11, D). Greffe unilatérale en 120-150° de crête neurale troncale. Les arcs branchiaux 1 et 2 sont plus minces du côté opéré, et les arcs 3 et 4 sont réduits à deux petits nodules cartilagineux. Aucune partie du crâne n'est marquée.

Tous les cas montrent des résultats analogues : le crâne est modifié, mais aucune pièce squelettique n'est jamais marquée. Ces deux observations concourent à montrer que la crête neurale troncale, implantée dans la tête, est incapable de donner naissance à des cartilages. Contrairement à la crête hétérotopique céphalique, elle ne subit du fait de son implantation dans la région céphalique, aucun changement dans ses potentialités. Les parties du crâne qui sont normalement issues du segment de crête céphalique qui a été remplacé par la crête troncale, sont absentes ; la présence même du greffon troncal contrarie sensiblement la régulation.

Ainsi la crête neurale troncale se révèle inapte à produire des cartilages. Une différence fondamentale existe donc, à cet égard, entre la crête neurale céphalique et la crête neurale troncale.

Conclusions.

Nous avons, au cours de ce travail sur l'origine du crâne, retrouvé et précisé les conclusions obtenues par Stone, Harrison, Raven, Hörstadius et Sellman principalement.

Au moyen des expériences d'ablations, et de greffes de segments de crête neurale hétérotopique, nous avons pu montrer que la crête

neurale est à l'origine du crâne presque tout entier, et que chaque partie de la crête neurale a un devenir propre : la crête neurale céphalique est régionalisée ; le tableau III présenté page 37, et la figure 10, F résument cette régionalisation. Cette régionalisation implique que la crête neurale est déterminée.

Par ailleurs, nous avons constaté l'importance des phénomènes de régulation, précisé leur étendue, et montré que cette régulation peut se réaliser selon deux voies, ou bien par l'intervention de cellules migratrices provenant de la crête neurale située du côté opposé, ou bien par l'intervention des cellules provenant des parties voisines de la crête neurale du côté opéré lui-même. Ces possibilités de régulation impliquent que la détermination de la crête neurale est encore labile.

Le marquage de la crête neurale par la thymidine tritiée permet de préciser davantage la régionalisation de la crête neurale céphalique, et de montrer que celle-ci participe dans les conditions normales à l'édification de la plaque basale et des cartilages parachordaux. Cette participation, toutefois, n'est pas indispensable pour la formation de ces pièces squelettiques.

Par des greffes hétérotopiques, nous avons montré que la crête neurale céphalique est déterminée qualitativement (valeur céphalique), mais que cette détermination est encore labile dans ses différenciations régionales et peut subir des modifications selon le lieu où elle a été implantée.

Enfin la crête neurale troncale est incapable de produire des cartilages crâniens quels qu'ils soient. Elle est donc aussi déterminée qualitativement (valeur troncale) ; nous reviendrons plus loin sur ce problème.

II. — Dents.

On a longtemps attribué aux dents une origine embryologique double : l'organe adamantin, producteur de l'émail, étant d'origine ectodermique, et provenant de l'invagination en profondeur de l'épithélium buccal, et les odontoblastes, producteurs de l'ivoire, situés à l'intérieur de l'organe adamantin, étant d'origine mésodermique.

Platt (1897), Adams (1924, 1931), De Beer (1947) ont montré que la papille dentaire est issue de l'ectomésenchyme, et que l'organe adamantin est d'origine ectodermique. Stone (1926), Raven (1932, 1935) et Hörstadius et Sellman (1946) observent que le nombre des dents est plus faible après ablation de la crête neurale, et que des cellules de la crête neurale peuvent être retrouvées dans la papille dentaire.

Nous avons repris, chez le Pleurodèle, ce problème des relations entre les dents et la crête neurale.

1) Dents des larves témoins.

Chez le Pleurodèle, la formation des dents se réalise selon un processus classique : dans la papille dentaire, des cellules appelées odontoblastes commencent à partir du stade 35 à produire l'ivoire ou dentine, tandis que les adamantoblastes déposent de l'émail à l'extérieur de l'ivoire. Les premières dents percent l'épithélium buccal au stade 37 (percement de la bouche).

Après cette première génération de dents qui percent entre le stade 37 et le stade 39, il s'en formera deux ou trois autres, à partir d'une « lame dentaire », repli ectodermique formé de deux couches de cellules accolées, qui s'est enfoncée dans le mésenchyme dès le stade 34.

Seule la première génération de dents sera étudiée ici ; les générations suivantes ne sont que des ébauches très peu développées aux stades 37, 38 et 39 auxquels nous nous plaçons. A ce moment, en effet, les dents de la première génération sont bien développées et possèdent leur morphologie définitive. La plupart de nos études ont été faites au stade 38, quelques dents seulement possédant au stade 37 la pointe acérée d'ivoire et d'émail qui permet d'identifier les dents complètement développées.

Le nombre des dents varie légèrement autour d'une moyenne (Tableau IV). La fig. 12, A traduit leur répartition.

TABLEAU IV.

	Dents palatines	Dents mandibulaires
Stade 38	23	25
Stade 39	23	23
Stade 40	24	26

2) Ablations unilatérales de la crête neurale céphalique.

16 cas d'ablations unilatérales d'une largeur de 30° ont fait l'objet d'un dénombrement : quelle que soit la région opérée, les ablations unilatérales de segments de 30° sont sans effet sur le nombre des dents (et sur le crâne).

Des ablations plus larges ont alors été pratiquées : les résultats sont résumés dans le Tableau V.

TABLEAU V.

	Dents palatines	Dents mandibulaires
Ablations 0- 45° (1 cas).	29	27
» 0- 90° (4 cas).	17,5	24
» 90-135° (2 cas).	22	25
» totale (4 cas).	17,5	24

On remarque sur les coupes que les dents sont inégalement réparties : elles sont plus nombreuses du côté non opéré. Pour éliminer les phénomènes de régulation, nous avons réalisé des opérations bilatérales.

3) Ablations bilatérales de la crête neurale céphalique : (18 cas).

Les résultats sont résumés dans le Tableau VI :

TABLEAU VI.

	Dents palatines	Dents mandibulaires
Ablations bilatérales 0- 45° (5 cas)...	13	28
» » 45- 90° (3 cas)...	17,5	17
» » 90-135° (2 cas)...	20	28
» » 0- 90° (4 cas)...	9	21
» » 70-120° (4 cas)...	21,5	15,5

On remarque que les dents palatines sont moins nombreuses après les ablations 0-45° (fig. 12, B), 45-90° (fig. 12, C) et 0-90° (fig. 12, D), tandis que les dents mandibulaires sont affectées par les ablations 45-90° et 70-120° (fig. 12, E).

Cette série d'ablations bilatérales montre d'une manière plus accentuée les résultats que nous avons déjà obtenus avec les ablations unilatérales : en effet les possibilités de régulation à partir de la crête neurale du côté opposé à l'opération n'existent plus.

Nous avons remarqué, aussi bien chez les témoins que chez les opérés, que les dents sont toujours, sauf exceptions très rares (2 dents font exception dans le cas H4, fig. 12, E), associées étroitement aux pièces cartilagineuses.

Nous reportant au tableau des dérivés squelettiques de la crête neurale que nous avons donné page 37, nous constatons la coïncidence rigoureuse entre l'origine des pièces squelettiques porteuses de dents (trabécules et cartilage de Meckel), et l'origine des dents portées par ces mêmes pièces squelettiques. Les régions de la crête neurale qui conditionnent la formation des dents sont celles-là mêmes qui conditionnent la formation des pièces squelettiques porteuses de dents. Le nombre des dents portées par chaque pièce squelettique, et par chaque partie de celle-ci, est étroitement lié à l'intégrité de cette pièce ; si les trabécules sont réduits ou déformés, le nombre des dents qu'ils portent est plus faible, et leur répartition topographique est modifiée ; si le cartilage de Meckel est aminci ou absent d'un côté, il n'y a pas de dents de ce côté.

En résumé, nous pouvons préciser en quelles régions de la crête neurale se trouve l'origine des dents :

dents palatines : région 30-70°

dents mandibulaires : région 70-100°.

4) Greffe de fragments de crête neurale troncale en position céphalique.

Des fragments de crête neurale troncale sont substitués à diverses régions de la crête neurale céphalique :

TABLEAU VII.

	Dents palatines	Dents mandibulaires
Greffe unilatérale en 0- 90° (5 cas) ..	18	27
Greffe unilatérale en 0-135° (2 cas) ..	25	21,5
Greffe bilatérale en 0- 90° (7 cas) ..	13	21

Après les opérations unilatérales les dents sont inégalement réparties des 2 côtés.

Les résultats de ces trois séries de greffes hétérotopiques montrent que la réduction du nombre des dents est beaucoup plus importante après les opérations bilatérales qu'après les opérations unilatérales. Les résultats sont, dans l'ensemble, comparables à ceux qui ont été obtenus par les ablations de la crête céphalique (fig. 12, F).

Légende de la Fig. 12.

Fig. 12. — A : disposition des dents chez une larve témoin au stade 38. Les dents de la mâchoire supérieure, figurées par des croix, sont disposées en 3 groupes : 1 groupe médian entre les extrémités antérieures des trabécules et 2 groupes latéraux, sous chacun des trabécules. Les dents de la mâchoire inférieure, représentées par des ronds, sont régulièrement disposées le long de la partie médiane du cartilage de Meckel. B : cas F'5 (ablation bilatérale des crêtes neurales céphaliques 0-45°) : trabécules raccourcis et fusionnés par leurs extrémités antérieures : 8 dents palatines seulement groupées au point de fusion des trabécules. Le cartilage de Meckel est normal et porte 28 dents. C : cas G'2 (ablation bilatérale des crêtes neurales céphaliques 45-90°) : trabécules légèrement modifiés ne portant que 14 dents, tandis que le cartilage de Meckel, fragmenté et incomplet, porte 23 dents. D : cas B'3 (ablation bilatérale des crêtes neurales céphaliques 0-90°) : les trabécules fusionnés et raccourcis ne portent qu'un seul groupe de 8 dents ; le cartilage de Meckel est normal et porte 25 dents. E : larve H 4 (ablation bilatérale des crêtes neurales céphalique 70-120°) : les trabécules peu modifiés portent 26 dents ; le cartilage de Meckel est réduit à trois petits fragments : le fragment médian, bien que très petit, porte 14 dents ; 2 autres dents mandibulaires sont isolées du côté gauche. F : cas C'4 (greffe hétérotopique bilatérale de crête troncale à la place de la crête céphalique 0-90°) : les trabécules fusionnés ne portent qu'un seul groupe de 15 dents ; le cartilage de Meckel fragmenté et aminci ne porte que 15 dents.

La crête troncale ne peut donc pas plus donner naissance à des dents, qu'elle ne peut donner naissance à des cartilages. A cet égard encore, elle est radicalement différente de la crête céphalique.

Ces expériences montrent que certaines parties bien définies de la crête neurale céphalique sont seules capables de donner normale-

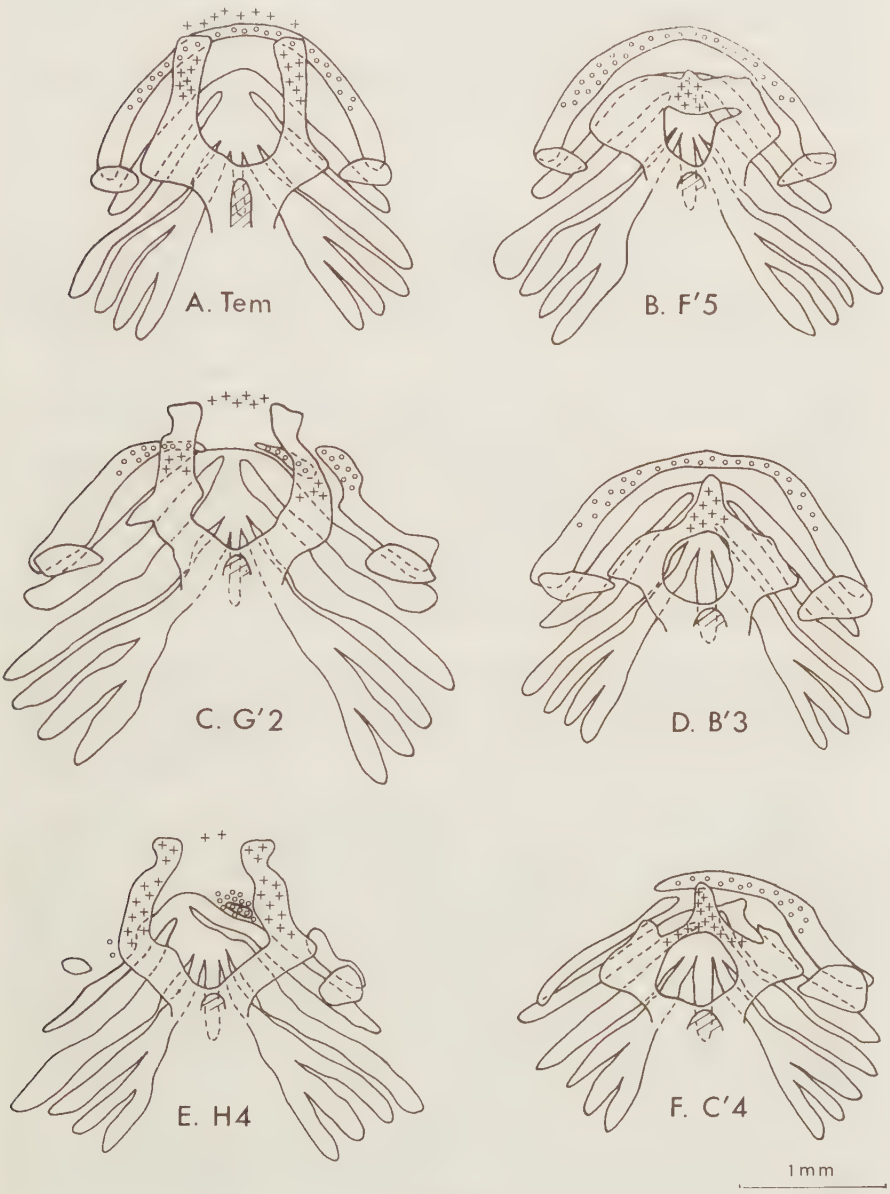

Fig. 12.

ment naissance à des dents. Lorsque ces parties ont été excisées, les dents ne se forment pas, ou ne se forment qu'en nombre réduit. Elles sont donc indispensables. Mais nous n'avons pu savoir si les deux éléments fondamentaux des dents, ou un seul de ces éléments et lequel, dérivent de la crête neurale. En effet, ou bien les dents sont présentes, ou bien elles sont absentes. Jamais on n'observe de dents formées seulement de l'organe adamantin ou de la papille dentaire : la dent est entière ou n'est pas.

Le marquage nucléaire par la thymidine tritiée permet de préciser le rôle de la crête neurale.

5) Greffe de fragments de crête neurale marquée par la thymidine tritiée.

— Greffes orthotopiques : sur les 40 opérations de ce type qui ont été réalisées, toutes celles qui portent sur les régions comprises entre les points 45 et 110° montrent des cellules marquées dans les dents. Des cellules marquées s'observent dans les dents palatines après les opérations portant sur le segment 30-70°, et dans les dents mandibulaires après les opérations portant sur le segment 70-100°.

Nous retrouvons par cette méthode exactement les mêmes localisations que par la méthode des ablations.

Dans plusieurs cas d'opérations unilatérales, des dents marquées sont présentes du côté opposé à l'opération. Il y a eu, là encore, répartition des deux côtés de l'embryon des cellules issues d'une seule crête neurale. Ceci est l'explication de la présence de dents du côté opéré dans les expériences d'ablations unilatérales. C'est un nouvel aspect du phénomène de régulation que nous avons déjà rencontré.

L'observation des autoradiographies montre que les cellules marquées présentes dans les dents sont toujours exclusivement les odontoblastes de la papille dentaire. En aucun cas, l'organe adamantin n'est marqué (Pl. III, fig. 28 et 29). Seuls les odontoblastes sont donc issus de la crête neurale.

— Greffes hétérotopiques : 8 cas de greffes hétérotopiques de crête céphalique ont été réalisés. Dans 7 cas, on ne trouve aucun marquage dans les dents ; mais dans 1 cas, on observe la présence de plusieurs dents marquées. Il s'agit du cas Th 22-5 (greffon 90-120° implanté en 0-45°), représenté à la fig. 11, A, dont nous avons déjà parlé à propos de la formation du crâne. Cette larve montre en effet des cellules marquées dans un trabécule et une moitié du cartilage de Meckel. Plusieurs des dents portées par le cartilage de Meckel sont marquées. L'arrivée de cellules issues de ce greffon implanté en 0-45° jusqu'à la partie postérieure du cartilage de Meckel implique que celles-ci ont migré suivant une voie différente de celle que suivent normalement les cellules issues de ce point de la crête neurale : ces cellules marquées ont rejoint, malgré un éloignement beaucoup plus considérable, la région du cartilage de Meckel qu'elles coloni-

sent dans les conditions normales. Aucune dent palatine n'est marquée. Ce cas de marquage des dents mandibulaires reste exceptionnel.

30 opérations de greffes de fragments de crête troncale ont été réalisées. Dans un seul cas (Th 47-18), on trouve des odontoblastes marqués. Cette exception est unique. Dans tous les autres cas, aucune des dents n'est marquée. La crête troncale s'avère dans 29 cas sur 30 absolument inapte à produire des odontoblastes, comme elle s'est avérée inapte à produire des cartilages crâniens. Il y a donc là encore une radicale différence entre les potentialités de la crête céphalique et celles de la crête troncale.

6) Discussion.

La crête neurale céphalique est, dans nos expériences, directement responsable de la formation des dents. Les régions 30-70° et 70-100° sont respectivement à l'origine des dents palatines et des dents mandibulaires. Les autres régions de la crête céphalique ne donnent pas (sauf une exception) naissance à des dents ; la crête troncale est inapte à produire des dents.

Les expériences d'ablations et de greffes de crête neurale marquée donnent des résultats rigoureusement concordants. Les observations histologiques sur la formation des dents chez les larves avaient montré que l'épithélium buccal produisait l'organe adamantin, mais l'origine des cellules de la papille dentaire, et des odontoblastes a été beaucoup plus difficile à découvrir. Le marquage de la crête neurale permet de distinguer radicalement ces deux composants et d'affirmer que, contrairement à l'opinion de Stroer (1933), les odontoblastes sont issus de la crête neurale. L'absence des odontoblastes, ou la réduction de leur nombre, en cas d'ablation bilatérale de la crête céphalique par exemple, entraîne l'absence ou la réduction du nombre des dents, alors que l'épithélium buccal n'a pas été modifié : c'est donc la présence des odontoblastes qui conditionne la formation de l'organe adamantin et, par là, de la dent tout entière.

Nous pensons pouvoir résumer le rôle de la crête neurale dans la formation des dents en distinguant deux processus successifs : tout d'abord, la crête neurale céphalique des régions 30-100° produit seule de futurs odontoblastes qui migrent vers le stomodeum ; ensuite ces odontoblastes exercent une action inductrice sur l'épithélium qui devient alors apte à former l'organe adamantin. L'action inductrice des odontoblastes sur l'épithélium peut s'exercer aussi bien sur un épithélium ectodermique (dans les cas normaux), ou sur un épithélium endodermique (Signoret, 1960).

Les dents sont bien des organes composites, formés de deux ébauches distinctes, mais qui sont toutes deux d'origine ectodermique.

III. — Mésenchyme.

Nous avons vu précédemment qu'après la pose de marques colorées sur la crête neurale céphalique, on voit se former sous l'épithélium

de la tête des traînées colorées et, à partir des stades 28 ou 30, on obtient des larves dont la tête comporte des régions différemment colorées. La dissection de telles larves montre que le colorant est contenu dans les cellules situées entre la peau et l'encéphale, et entre l'encéphale et les yeux. Ce tissu est le mésenchyme céphalique.

1) Ablations de la crête neurale.

Lorsque l'on pratique des ablations unilatérales ou bilatérales dont la longueur est inférieure à 30°, on ne remarque pas, à l'observation externe des larves, de changement dans l'allure générale de la tête. Mais, si on pratique des ablations bilatérales dont la longueur dépasse 45°, la tête des larves opérées est plus étroite, et bosselée, dans la région opérée. Le changement le plus important s'observe après les ablations bilatérales de la région 100-150° : les filaments branchiaux externes sont alors extrêmement réduits, ou totalement absents : chez les opérés parvenus au stade 38, la tête se rétrécit vers l'arrière et ne porte, dans les meilleurs cas, aucun filament branchial (Pl. I, fig. 8). Chez tous nos animaux opérés, le balancier était toujours présent.

Les examens sur coupes montrent chez ces opérés, en plus des malformations crâniennes que nous avons étudiées précédemment, une extrême réduction de mésenchyme : la peau est directement appliquée sur l'encéphale, les yeux sont au contact de l'encéphale et saillants à l'extérieur, la capsule otique est entourée de très peu de mésenchyme et fait saillie elle aussi à l'extérieur ; les muscles sont directement recouverts par la peau.

2) Greffes hétérotopiques de crête neurale.

Si on remplace des parties variées de la crête céphalique par d'autres portions de celle-ci, prélevées sur des neurulas donneuses, ou par des portions de crête troncale, la tête peut, dans beaucoup de cas, apparaître bosselée et de forme irrégulière. Mais les coupes montrent que le tissu mésenchymateux est présent en quantité normale dans toutes les parties de la tête.

Les greffons implantés dans la tête, quelle que soit leur origine, produisent du mésenchyme. L'aspect externe plus ou moins bouleversé de la tête de ces larves résulte des malformations squelettiques éventuelles entraînées par l'opération, et non de l'absence de mésenchyme.

3) Greffes de crête neurale marquée.

Nous avons réalisé 62 cas de greffes orthotopiques et hétérotopiques de crête neurale marquée. Dans tous les cas, quelle que soit la région d'origine du greffon, et quel que soit son lieu d'implantation, on observe en grande abondance du mésenchyme marqué dans toutes les parties de la tête, même la mâchoire inférieure. Les opérations unilatérales entraînent la présence du mésenchyme marqué des deux côtés de la tête .

Il est donc évident que le mésenchyme de la tête dérive de la crête neurale en très grande quantité : dans tous les cas expérimentaux, le mésenchyme est marqué. La crête neurale troncale implantée à la place de la crête céphalique peut produire du mésenchyme, alors que, nous l'avons vu, elle ne peut produire ni cartilages, ni odontoblastes. La crête troncale possède les mêmes capacités morphogénétiques que la crête céphalique en ce qui concerne la formation du mésenchyme.

IV. — Ganglions crâniens.

Après sa découverte selon laquelle les ganglions spinaux ont pour origine la crête neurale, His pensa que les ganglions crâniens aussi étaient issus de la crête neurale. Reprise par Landacre (1921), cette conception fut battue en brèche par Stone (1922 b, 1924). Plus tard, Knouff (1927) conclut de son étude chez *Rana pipiens*, que chacun des ganglions crâniens comprend une partie issue de la crête neurale et une partie issue de placodes ectodermiques. Van Campenhout (1935) affirme que l'origine du ganglion acoustique est la paroi de la capsule otique. Les résultats de Yntema (1937, 1943) pour les ganglions VII-VIII et IX-X vont également en ce sens : ces ganglions dérivent de placodes ectodermiques.

1) Ganglions crâniens des larves témoins.

Les ganglions crâniens des adultes sont déjà constitués chez les larves au stade 38. On trouve alors, de part et d'autre de l'encéphale, 3 masses ganglionnaires (fig. 13).

— la plus antérieure, située au niveau de l'infundibulum est le ganglion de Gasser, ou ganglion semi-lunaire, encore appelé ganglion V car il est situé à la racine du nerf crânien V (nerf trijumeau). Il est formé de deux masses bien distinctes : la partie antérieure, rattachée au cerveau, est formée surtout de petites cellules qui se colorent intensément, tandis que la partie postérieure, dorsale par rapport à la précédente, est formée surtout de cellules dont le noyau est plus grand et plus clair. La partie postérieure se superpose en avant à la partie antérieure, et se rattache en arrière au ganglion suivant. La longueur totale du ganglion V est de 400 à 450 µ.

— la masse ganglionnaire moyenne, moulée sur la capsule otique, est formée par la base commune du nerf facial et du nerf acoustique : c'est le ganglion acoustico-facial ou ganglion VII-VIII. Il comporte une partie antérieure large et épaisse formée surtout de grandes cellules claires, et une partie postérieure en continuité avec la précédente, formée surtout de cellules plus petites et plus foncées, située entre la capsule auditive et le cerveau. Sa longueur totale est de 450 µ environ.

— enfin la masse ganglionnaire postérieure, située en arrière de la capsule otique, est intercalée sur le trajet initial commun des nerfs glossopharyngien (nerf IX) et vague (nerf X) : c'est le com-

plexe glossopharyngien-vagal ou ganglion IX-X. Il est relié au bulbe rachidien par plusieurs racines et est constitué lui aussi d'une partie antérieure formée de petites cellules foncées, et d'une partie postérieure plus dorsale formée de cellules plus grandes et plus claires, qui donne naissance au nerf vague. Sa longueur totale est de 500 μ environ.

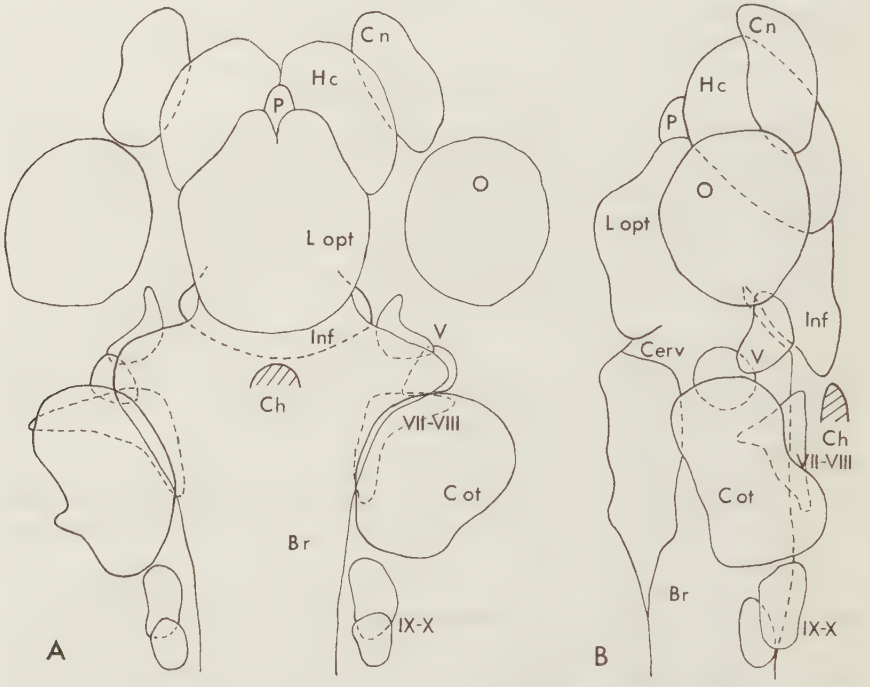

Fig. 13. — Reconstitution de l'encéphale, des capsules sensorielles et des ganglions crâniens d'une larve témoin au stade 38.

A : vue dorsale — B : vue latérale. Br : bulbe rachidien ; Cerv : cervelet ; Ch : chorde dorsale ; Cn : capsule nasale ; C ot : capsule otique ; H c : hémisphères cérébraux ; Inf : infundibulum ; L opt : lobes optiques ; P : paraphyse ; V : ganglion V ; VII-VIII : ganglion VII-VIII ; IX-X : ganglion IX-X.

2) Expériences portant sur la crête neurale.

a) *Ablations.*

L'examen des larves ayant subi une ablation de crête neurale céphalique montre que les ganglions crâniens sont présents dans tous les cas, même après les ablations les plus sévères. Tout au plus observe-t-on occasionnellement (7 cas sur 46) une réduction légère de l'un ou de l'autre.

b) *Greffes hétérotopiques* de crête neurale ou d'ectoderme banal à la place de la crête céphalique : 7 opérations de ces deux types

ont été réalisées. Toutes ont permis l'édification normale des ganglions crâniens. Dans 1 cas, la capsule otique est réduite et le ganglion VII-VIII absent totalement du côté opéré.

Devant ces résultats, nous nous sommes demandé si la présence des ganglions crâniens dans tous les cas n'était pas le résultat d'un phénomène de régulation. Nous avons alors utilisé le marquage nucléaire de la crête neurale, afin de voir si, dans les conditions normales réalisées par des greffes orthotopiques de crête neurale marquée, les ganglions crâniens dérivent de la crête neurale.

c) *Greffes orthotopiques de crête céphalique marquée.*

Sur les 40 opérations réalisées, intéressant la totalité des régions de la crête céphalique, 4 seulement ont entraîné la présence de cellules marquées dans les ganglions crâniens, tandis que 36 larves issues de ces opérations ne présentent aucun marquage de leurs ganglions crâniens. Les 4 cas où l'on trouve des cellules marquées dans les ganglions crâniens montrent seulement quelques cellules marquées. Ce résultat confirme les précédents : ce n'est pas la crête neurale qui est à l'origine des ganglions crâniens.

Quelle est alors l'origine des ganglions crâniens ? La rareté des exceptions que nous avons signalées ci-dessus suggère qu'elles pourraient être la conséquence d'un léger débordement de l'opération au-delà de la crête neurale : il se pouvait que nous ayons, dans quelques cas, débordé légèrement vers l'ectoderme situé à l'extérieur de la crête neurale, en sorte qu'un mince lambeau de celui-ci fût soit excisé, soit marqué.

3) Expériences portant sur l'ectoderme adjacent a la crête neurale.

a) *Expériences réalisées au stade neurula* (stade 15).

Les 3 cas exceptionnels que nous avons mentionnés dans lesquels le ganglion V est légèrement marqué, résultaient d'opérations dont la limite antérieure était située à 45°, et le seul cas où des cellules marquées s'observaient dans le ganglion IX-X résultait d'une opération dont la limite postérieure était 150° : nous avons donc réalisé les séries opératoires affectant l'ectoderme para-neural entre les limites 45 et 150°.

— Ablations de l'ectoderme para-neural : (7 cas) : tous les ganglions crâniens sont présents au stade 38. Cependant, dans 4 cas, l'oreille interne est réduite. Les ganglions crâniens sont présents malgré l'ablation de l'ectoderme para-neural. A partir de quels territoires ont-ils alors pris naissance ?

— Greffes orthotopiques d'ectoderme para-neural marqué : 21 opérations ont été réalisées, dans lesquelles l'ectoderme para-neural excisé est remplacé par un lambeau identique d'ectoderme prélevé au même point sur une neurula marquée. Le tableau VIII résume les résultats.

TABLEAU VIII.

Région opérée :	P. ant. V	P. post. V	C. ot.	VII-VIII	P. ant. IX-X	P. post. IX-X
En avant de 90° :						
0-45° Th 30-8.	—	—	—	—	—	—
50-90° Th 37-4.	+	+	—	+	—	—
Th 37-9.	+	+	—	—	—	—
70-120° Th 29-6.	—	+	—	+	—	—
Th 29-7.	—	+	—	+	—	—
En arrière de 90° :						
90-120° Th 37-3.	+	+	+	+	—	—
Th 37-6.	—	+	+	+	—	—
Th 40-4.	—	+	+	+	—	+
Th 40-6.	—	—	—	—	—	—
Th 41-4.	—	+	+	+	+	+
Th 41-6.	—	+	+	+	+	+
90-150° Th 29-3.	—	—	+	+	—	—
Th 29-4.	—	+	+	+	+	+
Th 29-5.	—	—	+	—	+	—
Th 30-7.	—	+	+	+	—	+
Th 40-10	—	+	+	+	+	—
120-150° Th 37-1.	—	—	—	—	+	—
Th 37-2.	—	—	—	—	+	+
Th 37-5.	—	—	—	—	—	+
Th 37-7.	—	—	+	+	—	+
Th 40-5.	—	—	—	—	—	+

Le signe — indique que le ganglion considéré n'est pas marqué.
Le signe + indique au contraire que le ganglion considéré est marqué.

On voit d'après ce tableau que tous les ganglions sont marqués en cas de marquage de l'ectoderme para-neural. Ils sont donc issus de lui. Chaque type d'opérations donne des résultats différents. On peut en déduire les localisations des territoires présomptifs de chacun des ganglions.

Le ganglion V est marqué dans sa partie antérieure pour les opérations ne s'étendant que jusqu'à 90°, tandis que la partie postérieure est marquée pour les opérations 50-90°, mais aussi 90-120° et 90-150°. Le territoire présomptif de la partie antérieure est donc voisin de 70°, et celui de la partie postérieure est situé sur la région 90° (Pl. III, fig. 18).

La capsule otique et le ganglion VII-VIII sont marqués ou non marqués simultanément dans 16 cas sur 20. Ils sont marqués 5 fois sur 6 après les opérations 90-120° et 1 fois sur 5 seulement après les opérations 120-150°. Leurs territoires présomptifs sont donc très voisins ou confondus, et situés entre 90 et 120° (Pl. III,fig. 19).

Le ganglion IX-X n'est marqué que pour les opérations postérieures à 90°, et aussi bien après les opérations 90-120° que 120-150°. On peut préciser que la partie postérieure est seule marquée

dans 4 cas sur 5 après les opérations 120-150°. Son territoire présomptif est donc localisé entre 90 et 150° ; la partie antérieure et la partie postérieure sont très voisines et situées autour du point 120° (Pl. III, fig. 20).

Nous obtenons ici la certitude que les ganglions crâniens dérivent de l'ectoderme para-neural ; s'ils sont présents même après ablation de celui-ci, c'est que l'ectoderme qui vient fermer la blessure produite par l'ablation est capable de se transformer en ganglions nerveux. Cette régulation s'effectue-t-elle à partir d'un tissu déjà déterminé, ou à partir d'un ectoderme indifférencié qui subit un changement radical de ses potentialités ? En d'autres termes, la formation des ganglions après ablation de leur territoire présomptif normal s'effectue-t-elle à partir d'un territoire qui est déterminé, mais qui normalement ne participe pas à la formation des ganglions, ou à partir d'un ectoderme indifférencié qui, amené d'une manière ou d'une autre à l'emplacement du territoire excisé, subit un changement de ses potentialités ? Y a-t-il un phénomène d'induction, qui s'exercerait sur l'ectoderme para-neural au stade où nous avons opéré ?

— Greffes d'ectoderme banal marqué à la place de l'ectoderme para-neural : (20 opérations) ; 10 cas ont comporté la greffe d'un lambeau d'ectoderme seul, prélevé sur la région ventrale de neurulas marquées, et 10 ont comporté la greffe d'un lambeau double d'ectoderme et de mésoderme, prélevés simultanément sur la région latéro-ventrale de neurulas marquées.

Dans la première série expérimentale (greffe d'ectoderme ventral marqué seul) les opérations ont été faites aussi longues que possible, de façon à recouvrir toute la région des territoires présomptifs des ganglions crâniens. Dans tous ces cas on a obtenu des ganglions crâniens marqués. Une partie de la peau de la tête est marquée, ainsi que les ganglions crâniens, alors que bien entendu ni le cerveau ni les cartilages ne sont marqués.

Lorsqu'un ganglion n'est pas marqué, il est issu par conséquent de son territoire présomptif normal resté en place, ou d'ectoderme voisin venu au cours de la cicatrisation occuper sa place ; mais toutes les cellules marquées sont nécessairement issues de l'ectoderme ventral greffé. Celui-ci, qui n'aurait normalement donné que la peau du ventre, a donc acquis une détermination nouvelle et est devenu capable de produire des ganglions crâniens. C'est là un phénomène d'induction typique.

Cette induction responsable de la formation des ganglions nerveux à partir de l'ectoderme peut s'exercer aussi bien sur l'ectoderme tronçal que sur l'ectoderme céphalique. Tout l'ectoderme est compétent pour répondre à cette action inductrice. Elle s'exerce encore au stade neurula ; c'est son intervention qui explique la présence des ganglions crâniens après ablation de leurs territoires présomptifs au stade neurula, et leur formation à partir d'ectoderme banal ventral.

Dans la deuxième série expérimentale (greffe d'un lambeau double d'ectoderme et de mésoderme banals marqués à la place de l'ectoderme para-neural) les opérations ont été également faites aussi longues que possible. Dans 5 cas les opérations atteignaient exactement la limite de la crête neurale, et dans les 5 autres cas on avait laissé intentionnellement une très étroite bande d'ectoderme céphalique entre la crête neurale et la région opérée.

— dans les 5 premiers cas, on observe toujours des ganglions marqués.

— dans les 5 derniers cas, un seul montre un ganglion marqué.

Pour les 5 premiers cas, l'oreille interne est marquée 1 fois et le ganglion VII-VIII 2 fois ; le ganglion IX-X est marqué 5 fois (Pl. III, fig. 21) ; seul le ganglion V n'est pas marqué. En outre, on retrouve abondamment dans la tête des tissus marqués (peau de la région latéro-dorsale, tissu musculaire et tubules pronéphrétiques) : ces tissus dérivent de l'ectoderme et du mésoderme greffés qui se sont différenciés conformément à leur destinée.

De cette série expérimentale nous pouvons tirer deux précisions nouvelles : d'abord au sujet de l'induction responsable de la détermination des ganglions crâniens : elle peut s'exercer même à travers une lame mésodermique ; ensuite au sujet de la localisation des territoires présomptifs des ganglions : ils se trouvent au pied même du bourrelet médullaire, juste à la limite de la crête neurale.

Ces opérations pratiquées au stade neurula montrent, en résumé, que ce n'est pas la crête neurale, mais l'ectoderme immédiatement adjacent, qui est à l'origine des ganglions crâniens. Nous avons pu établir la localisation des territoires présomptifs de chaque ganglion et montrer que la formation de ces ganglions à partir de l'ectoderme céphalique résulte d'une action inductrice qui s'exerce encore au stade neurula, et qui agit avec autant d'efficacité sur l'ectoderme troncal banal que sur l'ectoderme céphalique para-neural. Cette action inductrice peut même s'exercer à travers une lame mésodermique.

b) *Expériences réalisées au stade bourgeon caudal* (st. 22 et 26).

Nous avons pratiqué principalement des ablations bien localisées de l'ectoderme céphalique aux stades bourgeon caudal jeune (stade 22) et bourgeon caudal âgé (stade 26).

Opérations au stade bourgeon caudal jeune (stade 22) : A ce stade on distingue entre l'œil et le futur massif branchial, plus proche de ce dernier, une petite tache plus pigmentée que le reste de l'ectoderme. 36 opérations ont été réalisées : 10 sont des ablations « larges » et 24 des ablations « étroites » ; 2 sont des greffes orthotopiques d'ectoderme marqué (fig. 14).

— Ablations larges : elles intéressent les moitiés antérieure et postérieure des territoires qui séparent l'ébauche de l'œil du renflement formé par l'ébauche du pronéphros.

D 1 à 4 : ablation de la région comprise entre le bord postérieur de l'ébauche oculaire et le milieu du massif branchial. Dans les 4 cas on observe au stade 38 l'absence totale de la partie postérieure du ganglion V et de l'oreille interne, et l'extrême réduction du ganglion VII-VIII. La partie antérieure du ganglion V et le ganglion IX-X sont présents.

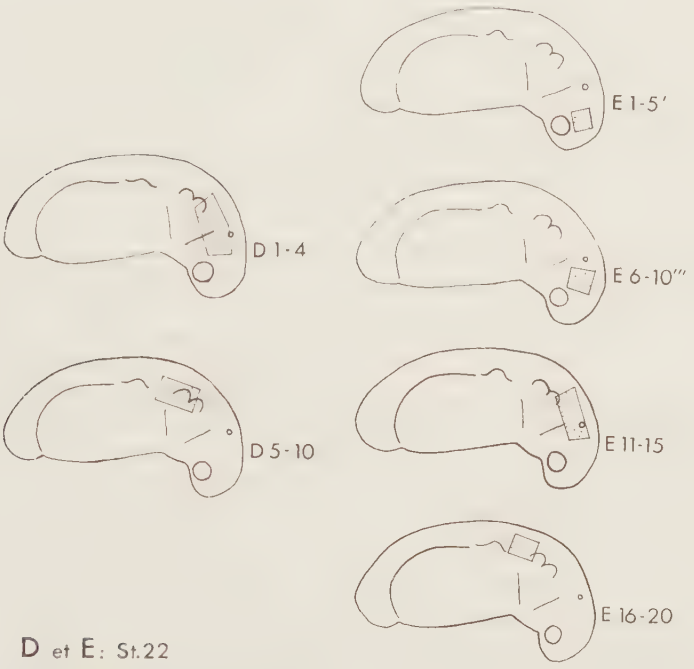

Fig. 14. — Opérations réalisées au stade 22 : ablations localisées de l'ectoderme céphalique. La région excisée est figurée en pointillé. Série D : ablations « larges ». Série E : ablations plus étroites.

D 5 à 10 : ablation de la région comprise entre le milieu du massif branchial et le renflement pronéphrétique. Dans les 6 cas la partie postérieure seule du ganglion IX-X manque.

Nous constatons donc que les ablations sont, ici, suivies de l'absence de tels ou tels ganglions crâniens : ceux-ci sont donc déterminés et la régulation n'est plus possible.

— Ablations étroites : elles ont été réalisées en 4 groupes de 6, 8, 5 et 5 embryons, et portent sur des régions deux fois plus courtes que dans la série précédente (fig. 14).

E 1 à 5' : ablation de la région située dorsalement par rapport à l'ébauche de l'œil. Tous les ganglions crâniens sont présents et normaux.

E 6 à 10''' : ablation de la moitié antérieure de la région comprise entre l'ébauche oculaire et le massif branchial. Dans les 8 cas tous les ganglions sont normaux, sauf le ganglion V qui, dans 3 cas, présente une partie postérieure réduite, et, dans 1 cas, une réduction de taille de ses deux parties.

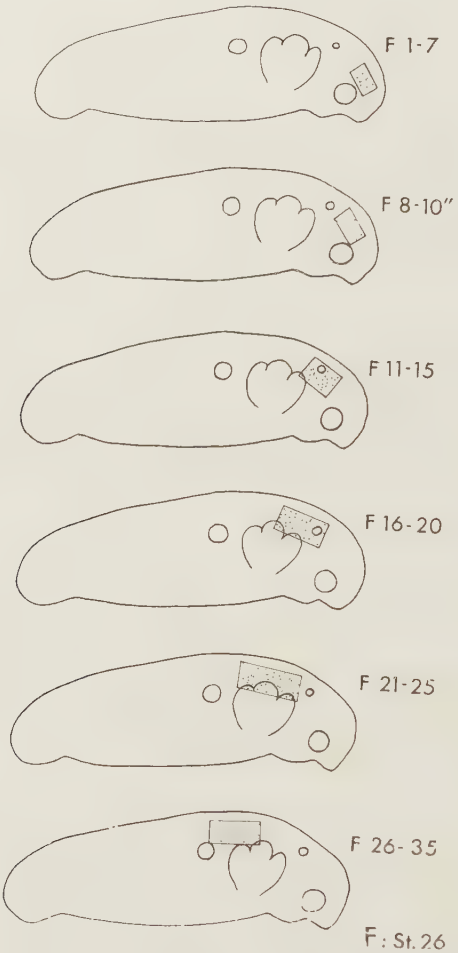

Fig. 15. — Opérations réalisées au stade 26 : ablations localisées de l'ectoderme céphalique. La région excisée est figurée en pointillé.

E 11 à 15 : ablation de la région centrée autour de la tache pigmentée. Dans les 5 cas, l'oreille interne et le ganglion VII-VIII sont absents ; dans 1 cas la partie postérieure du ganglion V est également absente.

E 16 à 20 : ablation de la région située en arrière du milieu du massif branchial. Dans les 5 cas, tous les ganglions crâniens sont présents et normaux.

Cette série expérimentale confirme que les ganglions crâniens manquent lorsque leurs territoires présomptifs sont excisés au stade 22 ; il n'y a plus, à ce stade, de possibilité de régulation. Elle nous permet aussi de connaître avec plus de précision l'emplacement des territoires présomptifs de chaque ganglion. Nous pouvons en effet les déduire des résultats obtenus dans les différents cas. Le cas du ganglion IX-X est particulier, puisqu'il n'est absent dans aucune des séries opératoires. Mais comme les régions excisées dans la série E 11 à 15 et dans la série E 16 à 20 ne se recouvraient pas exactement, nous pouvons penser que c'est précisément dans cette région que se trouve le territoire présomptif du ganglion IX-X ; ceci sera confirmé par la série opératoire suivante.

— 2 cas de greffe orthotopique d'ectoderme marqué confirment les résultats des ablations. L'opération intéressait la même région que dans la série D 1 à 4. On observe dans l'un des cas que le ganglion V est marqué et dans les deux cas que l'oreille interne et le ganglion VII-VIII sont marqués.

Les résultats obtenus grâce à cette série expérimentale sont résumés par le schéma 1 de la fig. 16. Les ganglions sont déterminés, et, à ce stade, la régulation n'est plus possible ; l'action inductrice responsable de leur détermination ne s'exerce plus, puisque l'ectoderme qui vient refermer la blessure provoquée par l'excision ne donne pas naissance à des ganglions.

Opérations au stade bourgeon caudal âgé (stade 26) : A ce stade la tache pigmentée qui, nous l'avons vu, représente l'ébauche de la capsule otique et du ganglion VII-VIII (placode otique) est beaucoup plus marquée. 33 opérations ont été réalisées ; elles se groupent en 6 catégories d'après la région excisée (fig. 15).

TABLEAU IX.

	V. ant.	V. post.	Or. int.	VII-VIII	IX-X ant.	IX-X post.
F 1 à 7.....	0	+	+	+	+	+
F 8 à 10'''....	0	0	+	+	+	+
F 11 à 15....	+	0	0	0	+	+
F 16 à 20....	+	0	0	0	+	+
F 21 à 25....	+	+	+	+	+	+
F 29 à 35....	+	+	+	+	+	0

Le signe 0 indique que le ganglion est absent ou très réduit.
Le signe + indique qu'il est présent.

Cette série expérimentale montre que les ganglions crâniens ne se développent pas après ablation au stade 26 des placodes ectodermiques correspondantes. Comme déjà au stade 22 il n'y a plus, à ce stade, de possibilité de régulation ; des divers cas expérimentaux, nous pouvons déduire les emplacements des placodes ectodermiques de chaque ganglion : le schéma 2 de la fig. 16 présente la localisation de ces placodes au stade 26.

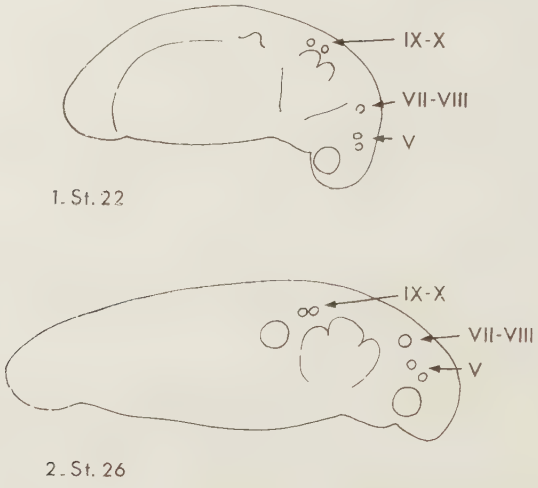

Fig. 16. — Localisation des placodes ectodermiques des ganglions crâniens : 1 : au stade 22. 2 : au stade 26.

Par rapport au stade 22 (fig. 16, schéma 1), on remarque que les ébauches des deux parties du ganglion V sont plus distantes l'une de l'autre, et que celles du ganglion IX-X se trouvent nettement en arrière du massif branchial, et non plus au-dessus de lui. Le ganglion VII-VIII est issu de la placode otique.

4) Discussion.

L'ensemble de ces résultats montre que la crête neurale ne participe pas à la formation des ganglions crâniens. Ceux-ci dérivent entièrement de placodes ectodermiques situées au stade neurula au voisinage immédiat de la crête neurale, mais bien distinctes de celle-ci. La possibilité d'obtenir des ganglions crâniens après remplacement de l'ectoderme para-neural par de l'ectoderme ventral du tronc, même en présence d'une couche de tissu mésodermique, montre que la détermination de ces ganglions est le résultat d'une induction qui s'exerce encore au stade neurula.

Mais dès le stade bourgeon caudal jeune, les ablations ne sont plus suivies de régulation : la détermination des territoires présomptifs des ganglions est réalisée, et l'induction qui en est respon-

sable ne s'exerce plus. Il en est de même au stade bourgeon caudal âgé. Nous avons pu préciser les localisations des territoires présomptifs de chaque ganglion à chacun des stades étudiés.

L'emploi du marquage nucléaire par la thymidine tritiée nous a permis de mettre en évidence l'induction qui s'exerce sur l'ectoderme et le rend apte à former des ganglions crâniens. Sans lui, nous n'aurions pu savoir si les ganglions formés dérivaient de cet ectoderme étranger ou des parties voisines de l'ectoderme céphalique.

Nous pensons donc que le problème de l'origine des ganglions crâniens trouve sa solution dans le sens que, dès 1922, Stone avait découvert en affirmant que les ganglions crâniens étaient dérivés « presque entièrement » de placodes ectodermiques. Nous allons plus loin que Stone en constatant que les ganglions crâniens dérivent intégralement de l'ectoderme, et que la crête neurale n'apporte à leur formation aucune contribution.

Nous n'avons retrouvé aucun résultat confirmant ceux de Knouff (1927), qui considère que la crête neurale participe à la formation de ces ganglions. Toutefois il faut remarquer qu'au stade neurula, les territoires présomptifs des ganglions crâniens sont extrêmement proches des bourrelets médullaires.

La mise en évidence du phénomène d'induction qui s'exerce au stade neurula, mais ne s'exerce déjà plus au stade bourgeon caudal jeune, pose le problème de son origine. Cette induction émane-t-elle directement du chordomésoderme responsable de l'induction neurale au sens propre, ou bien émane-t-elle d'un autre tissu, la plaque neurale ou la crête neurale par exemple ? Les expériences que nous avons réalisées ne permettent pas de répondre à cette question ; nous signalerons seulement ici les travaux de Holtfreter (1933) et Woerdeman (1946) qui ont montré qu'une action inductrice exercée par la crête neurale céphalique sur l'ectoderme troncal provoque la formation d'une nageoire dorsale. La crête neurale peut donc agir comme un inducteur.

V. — Encéphale antérieur.

Nous avons vu (page 37) que la région 0-30° ne donne naissance à aucune pièce squelettique. Les ablations squelettiques bilatérales de la région 0-30° entraînent seulement, dans un grand nombre de cas, la fusion des extrémités antérieures des trabécules. Le marquage nucléaire de cette région n'entraîne le marquage d'aucun cartilage. Au cours de cette étude, nous avions remarqué que la partie antérieure du cerveau était affectée par ces opérations. Les ablations des crêtes neurales antérieures produisent une diminution de taille des hémisphères cérébraux, ou la fusion totale de ceux-ci en une masse impaire médiane, tandis que leur marquage est suivi de la présence de nombreuses cellules marquées dans le cerveau antérieur.

Hörstadius et Sellman (1946) avaient remarqué déjà que la région tout-à-fait antérieure de la crête céphalique ne produit aucun cartilage, mais comporte une partie importante du matériel pré-

somptif du télencéphale et du diencéphale. Ceci fut confirmé par Van de Kamer (in Woerdeman et Raven, 1946) et von Woellwarth (1960).

Il nous fallait préciser, pour le Pleurodèle, le devenir exact de la partie antérieure de la crête neurale et son rôle dans la formation du cerveau.

Les ablations unilatérales se sont révélées de peu d'intérêt : elles sont suivies d'une régulation complète.

1) Ablations bilatérales de la crête neurale (18 cas).

Dans tous les cas, la région antérieure de l'encéphale est modifiée. Les hémisphères cérébraux sont raccourcis et fusionnés en une seule masse avec les lobes optiques, dont on ne les distingue parfois que par l'existence d'une constriction transversale. Ils sont dans la plupart des cas, totalement indistincts.

Dans 7 cas il n'y a qu'une seule narine externe médiane ; le conduit olfactif impair est situé entre l'encéphale et le cartilage trabéculaire médian. Il bifurque au niveau du début des yeux et s'ouvre toujours dans la cavité buccale par deux choanes distinctes. Dans les 11 autres cas il y a deux narines externes plus ou moins rapprochées l'une de l'autre.

La fig. 17 montre la reconstitution d'un cas moyen : les hémisphères cérébraux et l'épiphyse sont totalement absents. Les lobes optiques ont une configuration normale. Il n'y a qu'une seule narine externe ; le conduit nasal bifurque au niveau des yeux ; il y a deux narines internes.

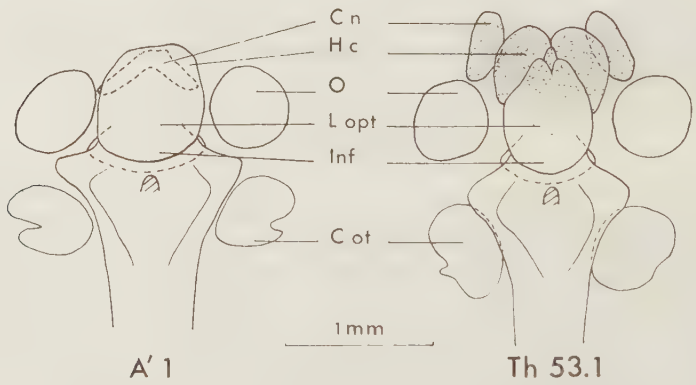

Fig. 17. — Reconstitution des encéphales et des capsules sensorielles d'un animal ayant subi au stade neurula l'ablation bilatérale des crêtes neurales céphaliques 0-30° (A'1), et d'un animal ayant subi au même stade la greffe orthotopique bilatérale des crêtes céphaliques 0-30° (Th 53.1). Dans le 1er cas, les capsules nasales sont partiellement fusionnées, le télencéphale et la partie antérieure du diencéphale manquent ; dans le 2e cas, ce sont précisément les capsules nasales, le télencéphale et la partie antérieure du diencéphale qui sont marqués. Ces territoires sont issus de la crête neurale.

Malgré ces importantes modifications, de telles ablations sont probablement suivies, dans ce cas aussi, d'une régulation plus ou moins complète puisque, comme Nieuwkoop, Niermeyer et Jansen (1964) l'ont montré, tous les territoires présomptifs du prosencéphale (télencéphale, diencéphale et yeux) sont encore totipotents au stade neurula et peuvent se remplacer mutuellement ; chacun d'eux peut donner naissance à ces trois formations. Il nous fallait donc éliminer ces possibilités de régulation.

2) Greffes orthotopiques du segment 0-30° marqué (16 cas).

Le cerveau a été reconstitué et on a figuré sur les reconstitutions les régions marquées ; dans 4 cas, la région antérieure du cerveau est quelque peu modifiée, et montre une masse télencéphalique présente, mais impaire : ces 4 cas ne seront pas pris en considération.

Dans les 12 autres cas les cellules marquées sont abondantes dans toute la région antérieure, depuis l'extrémité antérieure des hémisphères cérébraux, jusqu'au niveau des nerfs optiques. La masse entière des hémisphères cérébraux (télencéphale) est marquée, tandis que, dans le diencéphale, le marquage de la partie dorsale n'est constant que jusqu'au niveau de l'épiphyse ; en arrière de celle-ci, seule la partie ventrale est marquée (Pl. V, fig. 39 et 40). L'infundibulum n'est jamais marqué jusqu'à son extrémité postérieure.

En dehors du cerveau, des cellules marquées s'observent toujours dans l'épithélium olfactif. Dans 8 cas, il est fortement marqué, depuis les narines externes jusqu'aux choanes ; dans 4 cas, il n'est que partiellement marqué, dans la région des narines externes seulement.

Le cas Th 53.1 représenté également à la fig. 17 est un cas moyen représentatif de cette série. Les pointillés serrés représentent les parties du cerveau entièrement marquées, et les pointillés lâches, les parties qui ne sont marquées que du côté ventral. La comparaison avec l'animal A'1 fait ressortir l'absence, dans ce dernier cas, de tout le télencéphale et d'une partie du diencéphale, avec l'épiphyse.

En dehors du cerveau et de l'épithélium olfactif, on trouve un abondant mésenchyme marqué : la partie la plus antérieure de la crête neurale, comme toutes les autres parties, produit du mésenchyme.

3) Discussion.

Nos résultats confirment les travaux antérieurs, et démontrent que la région 0-30° de la crête neurale, qui ne produit pas de cartilages, est à l'origine du télencéphale entier, d'une grande partie du diencéphale et de l'épithélium olfactif. Elle donne naissance, en outre, à un abondant mésenchyme.

Le marquage nucléaire de la crête neurale par la thymidine tritiée permet d'éliminer les causes d'erreur dues éventuellement aux phénomènes de régulation. Dans ce cas précis, la comparaison des cas A'1 et Th 53-1 présentés côte à côte à la fig. 17 montre que les

parties de l'encéphale qui manquent chez l'animal A'1 sont exactement celles qui sont marquées chez l'animal Th 53.1. La crête neurale située en arrière du point 30° n'est pas capable de produire du tissu cervical. Il n'y a pas ici de régulation notable.

Nous avons remarqué précédemment que dans les cas d'ablations de la partie antérieure de la crête neurale, les extrémités antérieures des trabécules se soudent ; nous savons maintenant que ces opérations produisent une réduction considérable du volume du cerveau antérieur. Chez les larves opérées, l'extrémité antérieure, toujours impaire, de l'encéphale est soutenue par l'extrémité antérieure des trabécules soudés dans le plan médian : il y a une relation constante entre la présence d'un prosencéphale impair et celle d'un élément trabéculaire médian au-dessous de lui. Plus en arrière, au niveau du mésencéphale, les trabécules sont toujours pairs, de sorte qu'on est amené à penser que l'indépendance ou la soudure des trabécules dépend du volume du cerveau antérieur : si celui-ci est réduit, les cellules issues des deux crêtes neurales en arrière du point 30° se rejoignent sur la face ventrale de l'encéphale où elles forment une pièce cartilagineuse unique. Dans le cas normal, le télencéphale étant bien développé, ces cellules procartilagineuses ne se rejoignent pas, et édifient de chaque côté, sous chacun des hémisphères cérébraux, un trabécule distinct.

De cette manière, les vues de Goodrich (1930) qui considère les trabécules comme des structures absolument originales, développées en relation avec le cerveau antérieur et les sacs olfactifs, restent partiellement acceptables. En fait, les trabécules dérivent, nous l'avons vu, de la crête neurale, mais leur mise en place anatomique dépend effectivement de la configuration du cerveau antérieur.

Enfin, nos résultats sont en accord avec ceux de Zwilling (1940) qui, au moyen de marques colorées, a montré que l'ébauche de la placode olfactive est située au stade neurula à moitié dans le bourrelet neural antérieur, et à moitié dans l'ectoderme adjacent. Nous obtenons en effet un marquage intense, mais incomplet, de l'épithélium olfactif.

VI. — Cellules pigmentaires.

Harrison, le premier (1910), pensa que les cellules pigmentaires des Amphibiens pouvaient être issues de la crête neurale. Vingt ans plus tard des travaux expérimentaux confirmèrent ces premières observations ; ceci s'explique par la différenciation relativement tardive des cellules pigmentaires au cours du développement embryonnaire, et par l'impossibilité où l'on se trouve de distinguer les futures cellules pigmentaires pendant toute la période précédant leur différenciation.

Dushane réalisa de 1934 à 1938 des expériences cruciales qui établirent que la crête neurale est à l'origine de tous les types de cellules pigmentaires. Ces travaux ont été, depuis lors, repris par

de très nombreux auteurs qui ont étudié la différenciation et la répartition des cellules pigmentaires au sein de la peau, dans les conditions les plus diverses.

Les cellules pigmentaires, ou chromatophores, sont des cellules mobiles, d'aspect ramifié. Il en existe plusieurs types : les mélanophores, pigmentés en noir, contiennent dans leur cytoplasme des granules de mélanine, pigment insoluble noir ; les xanthophores ou lipophores, jaunes ou rouges, contiennent en solution des pigments de natures chimiques diverses (caroténoïdes principalement), tandis que les guanophores, argentés et brillants, contiennent dans leur cytoplasme de minuscules cristaux de guanine.

Nous rapporterons ici les observations que nous avons faites en insistant seulement sur les indications que permettent d'apporter les cultures d'explants de crête neurale céphalique, et la greffe de fragments de celle-ci sur la face ventrale de neurulas. Cette question sera reprise à propos des dérivés de la crête neurale troncale. Nous verrons alors, sur ce point, l'apport de la méthode de marquage nucléaire par la thymidine tritiée.

Les ablations de crête neurale céphalique n'entraînent pas l'apparition dans la tête de régions dépourvues de cellules pigmentaires. Même après des ablations bilatérales longues, 90-150° par exemple, les régions correspondantes de la tête contiennent des cellules pigmentaires. Comment ces résultats peuvent-ils s'expliquer ? La crête neurale céphalique ne produit-elle pas de cellules pigmentaires ?

1) Culture d'explants de crête neurale céphalique.

Les explants de crête neurale cultivés seuls ne se différencient pas, et se cytolysent au bout d'une dizaine de jours sans avoir donné naissance à des cellules pigmentaires. La différenciation de celles-ci ne se réalise que si le fragment de crête neurale est associé à un lambeau d'ectoderme banal. Les explants de crête neurale sont donc enveloppés dans un lambeau d'épiderme présomptif ; après 24 heures de culture, l'explant a pris la forme d'une sphère mince et transparente portant, à l'intérieur d'elle-même, un petit massif cellulaire compact constitué par le fragment de crête neurale lui-même. 30 explants de crête neurale céphalique ont été cultivés de cette façon : 6 explants provenaient de chacune des régions 0-45°, 45-90°, 90-120°, 120-150°, et 100-135°.

Dans tous les cas on a pu suivre la différenciation des mélanophores : ils apparaissent sur toute la surface de la sphère ectodermique au bout de 5 ou 6 jours de culture à 20°C. Jusqu'au 10e ou 12e jour, ils deviennent de plus en plus foncés et de plus en plus nombreux, puis vers le 15e jour l'explant se cytolyse, ses réserves vitellines étant épuisées. On n'observe pas de différence notable entre les explants d'origines différentes : les mélanophores apparaissent dans tous les cas après le même délai, et leur densité est sensiblement la même.

En culture, la crête neurale donne naissance à des mélanophores qui se répartissent dans toute la sphère ectodermique, et se différencient dans les mêmes délais ou un peu plus tard que chez l'embryon normal (Pl. III, fig. 23).

2) Greffe de crête neurale céphalique sur la face ventrale de neurulas.

La face ventrale des embryons reste totalement dépourvue de cellules pigmentaires jusqu'au stade 38 : c'est alors qu'apparaissent les premiers chromatophores, autour du cœur et du tube digestif. A partir du stade 44, le tube digestif, jusqu'alors visible par transparence à travers la paroi ventrale, est complètement caché par une couche continue de guanophores. On peut mettre à profit cette particularité de la face ventrale en y implantant des fragments de crête neurale : les cellules pigmentaires qui s'y différencieront avant le stade 38 ne peuvent être issues que du greffon.

Nous avons réalisé 12 greffes de ce type : les greffons provenaient des régions 0-60°, 60-120°, 0-45°, 45-90°, 90-120° et 120-150°.

On peut suivre ici l'apparition des 3 types de cellules pigmentaires : les mélanophores apparaissent les premiers à partir du 3e jour, et le plus souvent le 4e jour ; les guanophores apparaissent le 6e jour, et les xanthophores, qui donnent au greffon une couleur d'ensemble jaune, apparaissent nettement plus tard, vers le 14e jour.

Les premiers chromatophores différenciés apparaissent toujours dans le greffon lui-même, mais au cours des jours suivants ils migrent en dehors du greffon ; ils se dispersent peu à peu sur la face ventrale et, dans les meilleurs cas, la colonisent entièrement. On distingue très bien deux couches distinctes de cellules pigmentaires : l'une est située directement sous l'épiderme de la peau, tandis que l'autre tapisse la paroi interne de la cavité générale et colonise le tube digestif. A partir du stade 42 la face ventrale s'enrichit, comme chez les larves témoins, en mélanophores et surtout en guanophores, qui dès le stade 44 forment un écran continu masquant entièrement le tube digestif. On peut encore distinguer le greffon lui-même, mais on ne peut plus distinguer, parmi les cellules pigmentaires, celles qui dérivent du greffon. Peu à peu le greffon devient de plus en plus difficile à discerner, et la face ventrale acquiert une pigmentation qui efface totalement les effets de l'opération.

Dans quatre cas cependant, la même particularité a été observée : ce sont les cas où le greffon avait pour origine la crête neurale antérieure : 0-45°, et 0-60° ; les guanophores sont apparus presque en même temps que les mélanophores, et le greffon se présentait, au bout d'une dizaine de jours, sous la forme d'une masse bien individualisée, absolument noire, et parsemée de guanophores. Il avait donc produit une quantité inusitée de mélanophores et de guanophores, et son aspect ressemblait d'une manière étonnante à celui d'un œil (Pl. I, fig. 6).

Nous avons signalé ci-dessus que les territoires présomptifs des yeux sont situés à la partie tout-à-fait antérieure de la plaque neurale, et que la crête neurale 0-30° donne naissance au prosencéphale. Lors de la fermeture des bourrelets médullaires, la région 30-60° se trouve ramenée à proximité immédiate des territoires présomptifs des yeux ; or le développement des yeux se caractérise précisément par une différenciation précoce et très abondante de cellules pigmentaires : mélanophores tout autour de la rétine, et guanophores sur l'iris.

Enfin la dissection de deux animaux de cette série à l'âge de 2 et 6 mois a montré que, bien que la pigmentation de la face ventrale fût alors semblable à celle des témoins, l'intestin restait couvert de mélanophores dans la région qui était initialement la plus proche du greffon. Ces mélanophores introduits expérimentalement dans une région de l'organisme qui normalement n'en comporte pas, s'y sont différenciés et y subsistent indéfiniment.

En culture, nous avons obtenu la différenciation des mélanophores seuls, et la durée de ces cultures est limitée par l'épuisement des réserves nutritives des cellules. Les greffes sur la face ventrale de neurulas permettent, au contraire, la différenciation des 3 types de cellules pigmentaires, et la durée de vie de celles-ci n'est pas limitée.

Ainsi les cellules pigmentaires ont une capacité migratrice particulièrement grande, et c'est cette propriété qui explique que, malgré des ablations de crête neurale céphalique, la tête soit toujours entièrement pigmentée : les cellules pigmentaires issues des régions de la crête neurale qui ont été laissées en place colonisent entièrement la région, qui dans des conditions normales aurait reçu ses cellules pigmentaires du fragment de crête neurale enlevé. La tête est suffisamment courte pour que dans tous les cas les cellules pigmentaires restantes puissent la coloniser entièrement.

C. — DÉRIVÉS DE LA CRÊTE NEURALE TRONCALE.

I. — Squelette axial.

La crête neurale joue-t-elle un rôle dans la formation de la colonne vertébrale?

Il faut tout d'abord remarquer qu'au stade 38 le crâne larvaire est entièrement formé, alors que la chondrification des futures vertèbres s'amorce seulement : seule la partie dorsale de l'atlas est cartilagineuse. Les cartilages suivants se forment de proche en proche en direction postérieure : au stade 41, les basidorsaux des deux premières vertèbres seules sont chondrifiés. Au stade 44 (36 jours) des cartilages existent jusqu'au niveau du cloaque. La formation des cartilages est donc beaucoup plus tardive dans le tronc que dans la tête. Il est, par conséquent, nécessaire d'élever les larves bien au-

delà du stade 38 pour étudier les éventuels retentissements sur les cartilages prévertébraux des opérations portant sur la crête neurale.

1) Ablations de la crête neurale troncale.

Nous avons pratiqué 200 ablations bilatérales totales des crêtes neurales troncales: l'opération est aisée, mais la cicatrisation s'avère très difficile. La plupart des embryons se cytolysent au bout de quelques jours sans avoir cicatrisé entièrement. Une trentaine d'embryons ont cependant cicatrisé, et les larves correspondantes ont présenté un aspect très inusité sur lequel nous reviendrons plus loin (elles sont totalement dépourvues de chromatophores et ne possèdent pas de nageoire dorsale) mais aucune d'elles, le moment venu, ne s'est alimentée, et nous avons dû les fixer vers le stade 38 ou 39. Elles ont permis de très intéressantes observations sur lesquelles nous reviendrons, mais les effets de l'opération sur le squelette axial n'ont pu être étudiés, puisqu'au moment de leur fixation, le squelette troncal n'existe pas encore.

Les ablations totales unilatérales, par contre, sont bien supportées : la plaie cicatrise, et le tube nerveux se ferme normalement. Pourtant les larves sont souvent tordues. Les coupes effectuées dans deux de ces larves au stade 50 montrent quelques anomalies que nous étudierons plus loin dans la succession des ganglions rachidiens, mais les cartilages prévertébraux sont normalement développés. Connaissant l'étendue des phénomènes de régulation dans la crête neurale, nous avons pratiqué des ablations bilatérales n'affectant qu'une partie de la longueur du tronc.

Les ablations bilatérales localisées ont été réalisées sur une longueur représentant généralement le tiers de la longueur totale de la crête troncale, car il s'est avéré qu'une telle longueur permettait une cicatrisation satisfaisante et n'était pas suivie d'une régulation complète. Si la région opérée est plus courte, la cicatrisation se fait mieux, mais l'opération est sans effet.

Ablation bilatérale du premier tiers de la CN troncale : 30 cas
Ablation bilatérale du 2e tiers de la CN troncale : 31 cas
Ablation bilatérale du 3e tiers de la CN troncale : 12 cas.

Dans la moitié des cas environ la cicatrisation se fait mais les larves restent tordues ; la nageoire dorsale présente une échancrure profonde dans la région opérée. L'étude sur coupes montre diverses anomalies, mais la formation des cartilages n'est pas affectée : ils se forment dans la région opérée selon une chronologie normale et leur développement est satisfaisant. Detwiler et Van Dyke (1934) avaient obtenu des résultats identiques.

2) Greffes orthotopiques de crête neurale marquée.

Plus de 100 opérations de greffe orthotopique de crête troncale marquée ont été réalisées ; elles affectent des longueurs diverses des crêtes troncales et sont, soit bilatérales, soit unilatérales. Les auto-

radiographies montrent des cellules marquées dans les tissus ou organes qui tirent leur origine de la crête neurale : en aucun cas, on ne trouve de cellules marquées dans les cartilages prévertébraux. Même lorsque les cellules marquées sont nombreuses dans le mésenchyme et dans les ganglions rachidiens, il n'y en a aucune dans les cartilages entourant la chorde dorsale et la moelle épinière.

La crête neurale troncale ne participe donc en aucune façon à la formation des cartilages du tronc. Les conceptions classiques qui assignent aux sclérotomes mésodermiques l'origine des vertèbres gardent toute leur valeur.

3) Greffes hétérotopiques de crête neurale céphalique dans la région troncale.

Nous venons de voir que la crête troncale ne donne jamais naissance à des cartilages ; nous avions déjà vu (page 42) qu'elle n'en produit pas non plus si elle est implantée dans la tête à la place de la crête céphalique. L'expérience inverse, consistant à implanter des fragments de crête céphalique à la place de la crête troncale a été réalisée 12 fois. Dans 6 cas la crête céphalique n'était pas marquée, et dans les 6 autres cas elle était marquée par la thymidine tritiée.

Aucune des larves issues de ces opérations ne montrait, ni au stade 38, ni au stade 40, ni même au stade 55 a, le moindre cartilage supplémentaire. Dans les 6 cas où la crête céphalique greffée était marquée, les autoradiographies montrent des cellules marquées dans plusieurs tissus, mais aucune dans les cartilages. Il s'avère donc que la crête céphalique, qui produit de nombreux cartilages dans la tête, n'en produit pas si elle est transportée dans le tronc.

Stone avait obtenu des résultats différents en transplantant dans le tronc l'ectomésenchyme de la tête : il avait obtenu le développement de pièces cartilagineuses surnuméraires. Il opérait au stade du bourgeon caudal, en prélevant l'ectomésenchyme déjà en voie de migration. De même Ichikawa (1937) a obtenu la formation de cartilages après implantation dans le tronc d'ectomésenchyme déjà en cours de migration.

Hörstadius et Sellman (1946) obtiennent, à partir de la crête céphalique antérieure, la formation de cartilages dans 100 % des cas si celle-ci est greffée dans la tête, et n'en obtiennent jamais si elle est greffée dans le tronc. Ils concluent que c'est l'endoderme pharyngien qui, par son action inductrice sur les cellules de la crête céphalique, les rend aptes à produire des cartilages. Cette conclusion vient d'être confirmée par Petriconi (1964) : seuls, les explants de crête neurale ayant subi l'action prolongée d'un extrait de l'endoderme pharyngien deviennent capables de développer du cartilage.

Ainsi s'expliquent les différences dans les résultats obtenus par Stone (1926, 1929) et Ichikawa (1937) d'une part, Hörstadius et Sellman (1946), Newth (1954) et nous-même d'autre part : la crête céphalique n'acquiert l'aptitude à former du tissu cartilagineux que

sous l'action de l'endoderme antérieur ; cette action s'exerce au cours de la migration des cellules issues de la crête neurale, pendant qu'elles se trouvent au contact de celui-ci.

Cette action n'est cependant pas suffisante : l'on comprend que, dans les conditions normales, la crête troncale ne donne pas naissance à des cartilages puisqu'elle n'est jamais soumise à l'action inductrice de l'endoderme antérieur, mais lorsqu'elle est transportée dans la région céphalique, elle devrait alors en produire : or nous avons vu, grâce au marquage nucléaire, qu'il n'en est rien. La crête troncale, soumise à l'action inductrice de l'endoderme antérieur, ne produit tout de même pas de cartilages. Elle n'est pas compétente pour répondre aux stimuli inducteurs. Deux conditions s'ajoutent donc pour que des cartilages se forment à partir de la crête neurale : une condition intrinsèque : la compétence, et une condition extrinsèque : l'action inductrice. Si ces deux conditions ne sont pas réunies, la chondrification ne peut avoir lieu.

Cette notion de compétence de la crête neurale était jusqu'à maintenant restée inaperçue : nos expériences de greffes hétérotopiques de crête céphalique marquée dans le tronc et de crête troncale marquée dans la tête permettent de la mettre en évidence. La crête neurale céphalique est compétente vis-à-vis de l'action inductrice qu'exerce sur elle l'endoderme antérieur : elle produit alors des cartilages ; sans cette action inductrice, elle n'en produit pas. La crête neurale troncale n'est pas soumise, dans les conditions normales, à cette action inductrice et, même si elle y est soumise dans des conditions expérimentales, elle n'est pas compétente pour y répondre : en aucun cas, elle ne produit de cartilages.

II. — Ganglions rachidiens.

Les ganglions rachidiens sont les premiers dérivés de la crête neurale qui ont été reconnus comme tels (His, 1868). Cette découverte a été confirmée par Harrison d'abord (1904) au moyen d'ablations de la partie dorsale du tronc, puis par Detwiler (1937) et Detwiler et Kehoe (1939) au moyen de marques colorées. Raven (1936) confirme le rôle de la crête neurale dans la formation des ganglions rachidiens ; mais ses opérations étant unilatérales, les cellules de l'hôte sont nombreuses dans les ganglions rachidiens du côté opéré, et on ne peut savoir, à coup sûr, si elles proviennent de la crête neurale du côté non opéré ou du tube nerveux lui-même.

Dushane (1938) confirme le travail de Harrison, mais Hilber (1944) considère que l'origine des ganglions rachidiens est à rechercher dans le tube nerveux lui-même ; cet auteur ne pratiquait ses ablations que sur une très courte région du tronc, et nous savons combien est grande la faculté de migration des cellules de la crête neurale.

Nous avons repris ce problème suivant les méthodes classiques d'ablations, puis nous avons pratiqué des greffes de crête neurale marquée.

1) Ablations de la crête neurale (37cas).

a) *Ablations unilatérales (5 cas)* : on observe une nette perturbation dans la disposition des ganglions rachidiens : au lieu d'être disposés en deux files parfaitement régulières, de part et d'autre de la moelle épinière, à raison d'une paire par segment, ils sont disposés du côté opéré d'une manière irrégulière. Ils sont légèrement moins nombreux et ne sont ni équidistants, ni situés toujours au même niveau que du côté non opéré. Ils sont plus petits. Il n'y a cependant pas de diminution massive de leur nombre. Tels sont les cas O 1 et O st. 50 représentés à la figure 18, A.

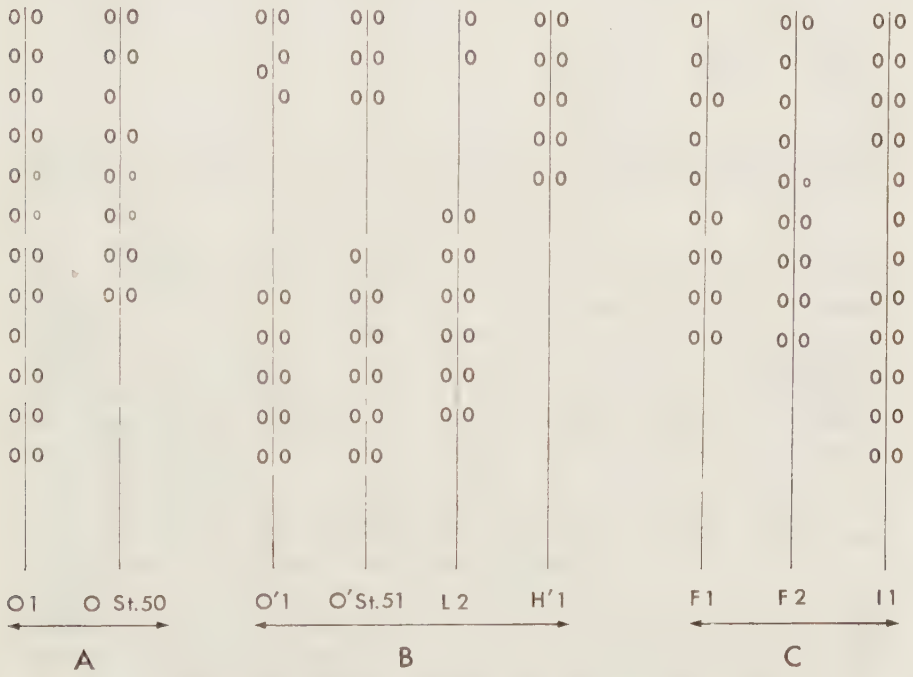

Fig. 18. — Disposition des ganglions rachidiens dans le tronc après des ablations de crêtes neurales. A : ablations unilatérales de la crête neurale tronçale droite : du côté opéré, quelques ganglions rachidiens sont absents ou de taille réduite. B : ablations bilatérales localisées des crêtes neurales troncales : O'1, O' st 51 et L 2 : ablation bilatérale du 2e tiers ; H'1 : ablation bilatérale de la moitié postérieure des crêtes neurales. Dans la région opérée, les ganglions rachidiens manquent entièrement des deux côtés. C : greffe hétérotopique unilatérale de crête céphalique : du côté opéré, les ganglions rachidiens sont moins nombreux. Les ovales de petite taille représentent les ganglions rachidiens de taille réduite.

b) *Ablations bilatérales localisées* (32 cas) : elles donnent des résultats beaucoup plus concluants. Si l'ablation représente moins de 1/4 ou 1/3 de la longueur totale, il arrive qu'aucun ganglion ne manque ; les déficiences nettes ne se manifestent qu'après l'ablation de 1/3 au moins de la longueur totale. On observe alors une absence

totale, bilatérale, des ganglions rachidiens dans la région opérée. Le Tableau X rend compte de 5 cas expérimentaux de ce type (voir également fig. 18, B et Pl. IV, fig. 31).

TABLEAU X.

Numéro des somites	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Ablation du second tiers													
L 2	1	1	0	0	0	+	+	+	+	+	+		
L 3	1	1	0	0	0	0	+	+	+				
0'1	+	+	1	0	0	0	0	+	+	+	+	+	
0' st. 51	+	+	+	0	0	0	1	+	+	+	+	+	
Ablation de la seconde moitié													
H' 1	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0			

Le signe + indique que les 2 ganglions rachidiens du somite considéré sont présents. Le signe 0 indique que les 2 ganglions rachidiens manquent. Le chiffre 1 indique qu'un seul ganglion rachidien est présent.

L'absence de ganglions dans la région opérée est manifeste. Toutefois la région dépourvue de ganglions ne correspond pas rigoureusement à la région opérée : lorsque l'ablation a été faite dans le deuxième tiers du tronc, on voit que, chez les larves, les ganglions rachidiens sont plus nombreux en arrière de la région opérée qu'en avant. De même, lorsque l'ablation a été faite dans la deuxième moitié du tronc, plus de la moitié de la longueur de la larve est dépourvue de ganglions. Ceci est la conséquence du phénomène mis en évidence au début de ce travail au moyen des marques colorées : au cours du développement, la région postérieure s'allonge beaucoup plus que la région antérieure, de sorte qu'un repère situé au stade neurula au milieu de la région troncale se trouve à partir du stade 32 vers la fin du premier tiers du tronc. On observe que, dans les régions où les ganglions rachidiens sont absents, les racines dorsales des nerfs rachidiens sont également absentes, ou extrêmement ténues, alors que les racines ventrales ne sont pas atteintes.

c) *Ablations bilatérales totales* : elles cicatrisent très difficilement. 10 % seulement des embryons opérés atteignent le stade 38. Les larves ne s'alimentent pas, mais leur organogenèse est alors suffisamment avancée pour que leur étude soit riche d'enseignements. La répartition des ganglions rachidiens de 6 larves de ce type est indiquée dans le Tableau XI.

La quasi-totalité des ganglions rachidiens manquent : 3 larves ne possèdent même aucun ganglion rachidien jusqu'au niveau du cloaque. Le cas M 6 qui présente des ganglions rachidiens à partir du 4e somite est, sans aucun doute, le résultat d'une ablation imparfaitement réussie dans la région postérieure : une ablation incomplète se ramène finalement à une absence d'ablation.

TABLEAU XI.

Numéro des somites	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
M 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+		
M 3	0	0	0	0	0	0	0	0					
M 4	0	0	0	0	0	0	0	0					
M 5	0	0	0	0	0	0	0						
M 6	0	0	0	+	+	+	+	+	+				
M 7	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+			

Le signe + indique que les 2 ganglions rachidiens du somite considéré sont présents. Le signe 0 indique que les 2 ganglions rachidiens manquent.

2) Greffes hétérotopiques de crête neurale céphalique (6 cas).

Dans tous les cas, la répartition des ganglions du côté opéré est modifiée : dans 2 cas ils sont moins nombreux et irrégulièrement disposés, et dans 4 cas ils sont absents sur une certaine longueur (fig. 18, C).

La crête céphalique ne peut donc donner naissance à des ganglions rachidiens au même degré que la crête troncale. Mais ces expériences ne suffisent pas pour montrer si la crête céphalique ne participe pas du tout ou participe un peu à la formation de ces ganglions rachidiens petits ou moins nombreux. Les ganglions présents que l'on rencontre dans 2 cas résultent-ils seulement d'une régulation imparfaite à partir de la crête neurale opposée, ou sont-ils issus en partie ou en totalité de la crête céphalique greffée ?

3) Greffes orthotopiques de crête neurale marquée (42 cas).

Les opérations ont été faites soit sur une seule crête neurale, soit sur les deux, et sur des longueurs variées du tronc.

On observe toujours que les ganglions rachidiens sont marqués. Dans les opérations bilatérales, le marquage de l'ensemble du ganglion est plus complet que dans les opérations unilatérales (Pl. IV, fig. 32). Les ganglions sont marqués dans toutes leurs parties ; l'intensité du marquage des cellules n'est pas uniforme dans un même ganglion : certaines sont très marquées, d'autres le sont très peu, ce qui conduit à penser que l'activité mitotique des cellules d'un même ganglion n'est pas égale.

Ces expériences sont la contre-épreuve des expériences d'ablations : les ganglions rachidiens sont issus de la crête neurale troncale.

4) Greffes hétérotopiques de crête neurale marquée.

Dans 9 cas, des fragments de crête céphalique marquée ont été implantés à la place de la crête troncale : dans 5 cas on constate, dans la région opérée, l'absence complète de ganglions rachidiens ; aucun des ganglions situés en avant et en arrière de la région opérée

ou du côté opposé, ne présente de cellules marquées. Cependant la moelle épinière est partiellement marquée et le mésenchyme marqué est abondant. Dans 4 cas, la région opérée possède des ganglions rachidiens, ils sont plus petits que les ganglions normaux et sont marqués.

Cette série montre que, dans la moitié des cas, la crête neurale céphalique implantée dans la région troncale ne donne naissance à aucun ganglion rachidien, et que, dans les autres cas, elle donne naissance à des ganglions rachidiens peu nombreux et petits. Son aptitude à produire des ganglions rachidiens est donc faible, mais elle n'est pas nulle.

Ce résultat est quelque peu inattendu puisque la crête céphalique ne participe pas à la formation des ganglions crâniens. Son aptitude à former des ganglions rachidiens est faible puisque dans la moitié des cas elle n'en forme pas, et lorsqu'elle en forme, ils sont réduits en taille et en nombre. Cette aptitude s'ajoute aux phénomènes de régulation pour remplacer partiellement les ganglions rachidiens qui seraient normalement issus du fragment de crête troncale excisé. Il reste que cette possibilité est faible, mais existe.

En résumé, nos expériences d'ablations, de greffes orthotopiques et hétérotopiques, et de marquage nucléaire montrent que dans les conditions normales les ganglions rachidiens dérivent entièrement de la crête neurale troncale. En cas d'ablations unilatérales de crête neurale, une régulation partielle intervient : du côté opéré, on trouve tout de même des ganglions rachidiens, petits et irrégulièrement disposés (Lehmann et Youngs, 1952). En cas d'ablations bilatérales sur une longueur suffisamment grande, aucune régulation n'est possible. Lorsque la crête neurale est marquée par la thymidine tritiée, les ganglions rachidiens sont entièrement marqués. Le rôle de la moelle épinière dans leur formation est nul.

Enfin, grâce aux conditions expérimentales réalisées, nous avons vu que la crête neurale céphalique est, dans 50 % des cas environ, capable de donner naissance à des ganglions rachidiens qui restent mal développés. Une suppléance limitée de la crête troncale par la crête céphalique est ici possible.

Les ganglions rachidiens se révèlent donc, du point de vue de leur origine, totalement différents des ganglions crâniens. Ils sont issus de la crête neurale troncale, seule capable de permettre leur développement normal.

III. — Cellules de Rohon-Béard.

Les cellules de Rohon-Béard, situées à la partie tout-à-fait dorsale de la moelle épinière chez les Amphibiens, sont nettement plus grandes que les autres cellules de la moelle épinière et possèdent un gros noyau clair (Pl. IV, fig. 33). Elles n'existent que durant la vie larvaire et disparaissent peu avant la métamorphose. D'après Dushane (1938) les cellules de Rohon-Béard sont issues de la crête neu-

rale et seraient responsables de la sensibilité tactile dans le tronc. Elles sont connues aussi chez les Téléostéens et les Dipneustes, et désignées également sous le nom de cellules de Mauthner.

1) Cellules de Rohon-Béard des larves témoins.

Les cellules de Rohon-Béard sont bien différenciées chez le Pleurodèle à partir du stade 36 ; nous les avons comptées, chez des larves témoins, à plusieurs stades, pour toute la région du tronc depuis la tête jusqu'à l'ouverture cloacale.

Le Tableau XII résume ces observations : le nombre de cellules de Rohon-Béard indiqué est le nombre moyen dans chaque métamère.

TABLEAU XII.

Stade	Nombre moyen de cellules de Rohon-Béard par métamère
36	22
37	20
38	14
39	14
43	12
50	8
52	6

Ce nombre est maximum au moment de l'éclosion, et nul à la métamorphose. Dès le stade 50, les cellules de Rohon-Béard sont presque de la même taille que les autres cellules de la moelle épinière, mais leur noyau reste clair, et leur nucléole net. Au stade 52, il devient difficile de les distinguer, et aux stades suivants il n'est plus possible de les compter avec certitude.

2) Ablations de la crête neurale troncale (19 cas).

— Ablations unilatérales : elles entraînent une réduction dissymétrique de la partie dorsale de la moelle épinière et l'absence des cellules de Rohon-Béard du côté opéré. Du côté non opéré, quelques cellules de Rohon-Béard seulement sont présentes, au nombre de 2 à 5 par métamère.

— Ablations bilatérales : elles entraînent toujours une nette réduction de la partie dorsale de la moelle épinière et une absence totale des cellules de Rohon-Béard dans la région opérée.

Le tableau XIII indique, pour 4 cas représentatifs, la répartition des ganglions rachidiens et le nombre de cellules de Rohon-Béard présentes dans chaque métamère.

Ce tableau montre que dans les métamères qui ne contiennent pas de ganglion rachidien on ne trouve aucune cellule de Rohon-Béard, ou un nombre très faible compris entre 1 et 5. Le dernier métamère dépourvu de ganglion rachidien possède souvent quelques cellules de Rohon-Béard : leur situation atteste qu'elles pro-

TABLEAU XIII.

Numéro des somites		1	2	3	4	5	6	7	8	9
D 1	gangl. rach.	0	0	0	0	2	2	2	2	
	cell. R. B.	0	0	0	2	13	7	11	13	
L 2	gangl. rach.	1	1	0	0	0	2	2	2	
	cell. R. B.	2	3	3	1	10	10	13	14	
L 3	gangl. rach.	1	1	0	0	0	0	2	2	
	cell. R. B.	0	0	0	0	2	0	5	15	
O' 1	gangl. rach.	2	2	1	0	0	0	0	2	2
	cell. R. B.	4	3	1	0	0	0	5	5	10

viennent par migration du segment suivant. Les métamères qui contiennent un seul ganglion rachidien contiennent également quelques cellules de Rohon-Béard : l'ablation des crêtes neurales n'avait pas été complète au niveau de ces métamères.

3) Greffes hétérotopiques de crête neurale céphalique (6 cas).

Il n'y a aucune cellule de Rohon-Béard du côté opéré, et celles qui existent du côté non opéré sont en nombre variable d'un cas à l'autre, le nombre moyen étant de 6 par métamère. Ce nombre de 6 est sensiblement la moitié du nombre normal qui est de 14 au stade 38 ; il confirme donc que les cellules de Rohon-Béard sont issues de la crête neurale troncale et ne peuvent pas être produites par la crête neurale céphalique.

4) Greffes de crête neurale marquée.

Les cellules de Rohon-Béard ont été étudiées dans les 42 cas de greffes orthotopiques de crête troncale marquée qui ont permis déjà l'étude des ganglions rachidiens. Dans tous les cas, les greffes bilatérales ont pour conséquence le marquage de toutes les cellules de Rohon-Béard. Dans les régions opérées, il ne se trouve aucune cellule de Rohon-Béard non marquée (Pl. IV, fig. 34). Les greffes unilatérales montrent que les cellules de Rohon-Béard du côté opéré sont marquées ; celles qui sont situées du côté non opéré ne sont pas marquées.

Enfin les greffes hétérotopiques de crête céphalique marquée produisent, comme nous l'avons vu ci-dessus, une diminution du nombre des cellules de Rohon-Béard et aucune de celles-ci n'est marquée.

Ces résultats confirment ceux que nous avons rapportés précédemment : les cellules de Rohon-Béard dérivent de la crête neurale troncale. La crête neurale céphalique n'est pas capable d'en produire.

Les marquages montrent qu'en plus des cellules de Rohon-Béard, la partie dorsale de la moelle épinière (formée de cellules identiques

à toutes les autres cellules de celle-ci) est également marquée : environ 1/3 à 1/4 de la moelle épinière est formé de cellules qui sont originellement situées dans les bourrelets médullaires.

Lorsque le greffon est d'origine céphalique, il s'assimile mal ou pas du tout à la moelle épinière, ou reste même totalement séparé d'elle. Nous avons vu que, sauf sa partie tout-à-fait antérieure, la crête céphalique ne donne pas naissance à du tissu nerveux ; implantée dans le tronc, elle ne subit pas de modifications : elle ne produit ni cellules de Rohon-Béard ni cellules nerveuses banales.

IV. — Cellules de la gaine de Schwann.

La gaine de Schwann ou névrilème, est constituée d'une couche de cellules qui enveloppent les axones. Ses cellules sont extrêmement minces et les corps cellulaires sont difficiles à distinguer, mais leurs noyaux allongés constituent des renflements bien visibles. Harrison pensait, après un premier travail (1904) que les cellules de la gaine de Schwann, en partie au moins, dérivent de la crête neurale. Müller et Ingvar (1921) parviennent à la même conclusion ; mais Kuntz (1922) affirme que les racines ventrales des nerfs rachidiens possèdent des cellules de Schwann issues de la moelle épinière. Dans un deuxième travail (1924) Harrison confirme ses premiers résultats, en précisant qu'ils concernent surtout les stades précédant l'éclosion.

Yntema (1937) montre que les cellules de Schwann des VII[e] et VIII[e] paires de nerfs crâniens sont issues, à la fois, de la crête neurale et des placodes ectodermiques. Raven (1936-1937) conclut que les cellules de Schwann des nerfs rachidiens sont issues de la moelle épinière et non de la crête neurale. Enfin Triplett (1958) aboutit à la conclusion que la crête neurale et la plaque neurale sont toutes deux à l'origine des cellules de la gaine de Schwann.

Ce problème de l'origine des cellules de Schwann a donc suscité de nombreux travaux ; deux origines leur ont été attribuées : ou bien la crête neurale, ou bien le tube nerveux lui-même. Nous avons repris ce problème au moyen des méthodes expérimentales employées déjà par les auteurs cités, et aussi au moyen du marquage nucléaire, soit de la crête neurale, soit du tube nerveux.

1) Ablations bilatérales de la crête neurale.

Connaissant déjà l'étendue des phénomènes de régulation, nous ne prendrons ici en considération que les ablations bilatérales, portant sur une longueur au moins égale à un tiers de la longueur du tronc (25 cas), ou même sur toute la longueur du tronc (18 cas). Les larves ont été fixées aux stades 38, 40, 43, 50, 54 et 55. Dans tous les cas, les cellules de Schwann sont présentes autour des nerfs rachidiens. Même dans le cas où la moelle épinière est notablement réduite et où les ganglions rachidiens et les cellules de Rohon-Béard manquent, les racines ventrales des nerfs rachidiens sont présentes

et comportent de très nombreuses cellules de Schwann (Pl. IV, fig. 35). En aucun cas, nous n'avons trouvé de nerf qui ne fût pourvu de cellules de Schwann.

Ces résultats confirment ceux de Kuntz et Raven : les cellules de Schwann ne paraissent pas issues de la crête neurale. Nous avons voulu alors vérifier les résultats de Raven, dont les greffes interspécifiques montraient le rôle joué par la moitié ventrale du tube nerveux dans la formation des cellules de Schwann.

2) Ablations de la moitié ventrale du tube nerveux.

14 opérations de ce type ont été réalisées avec succès ; le territoire chordal situé juste au-dessous n'a pas été lésé et la cicatrisation s'est effectuée. Pourtant le tronc de ces larves était plus ou moins tordu, et plusieurs présentaient une nageoire dorsale double. Sur les coupes, la moelle épinière apparaît très incomplète ; elle est même, dans la moitié des cas, formée de deux cordons parallèles distincts, la soudure des bourrelets médullaires ne s'étant pas effectuée normalement. Cependant les ganglions rachidiens et les nerfs rachidiens sont présents, et tous possèdent des cellules de Schwann en quantité normale. Ces résultats semblent indiquer que la moitié ventrale du tube nerveux n'est pas la source des cellules de Schwann, ou tout au moins pas leur source exclusive.

3) Ablations des deux bandes latérales du tube nerveux.

Nous avons excisé les parties latérales de la moelle épinière, et pour cela réalisé, au stade neurula, l'ablation de deux bandes longitudinales situées dans le territoire présomptif du tube nerveux, à la limite même des bourrelets médullaires. De la sorte, les parties dorsale et ventrale de la moelle épinière sont préservées. 12 neurulas ont été opérées de cette manière : les larves présentaient, au moment de leur fixation (stade 38), un aspect normal. 5 autres neurulas ont été opérées d'un seul côté. Les coupes montrent une moelle épinière souvent divisée en deux masses séparées ; les ganglions rachidiens sont présents et tous les nerfs rachidiens que l'on peut distinguer comportent des cellules de Schwann. Les opérations unilatérales produisent des modifications plus légères : la moelle épinière est sensiblement normale, les ganglions rachidiens sont régulièrement disposés, et les nerfs rachidiens possèdent un nombre normal de cellules de Schwann.

De ces trois types d'ablations ne résultent donc ni l'absence, ni même la raréfaction des cellules de Schwann ; les ablations de la crête neurale, de la partie dorsale de la moelle épinière, de sa partie ventrale, ou de ses parties latérales, ne provoquent jamais l'absence des cellules de Schwann. Pour éliminer toute possibilité de régulation il eût fallu faire l'ablation du tube nerveux tout entier, mais alors le système nerveux, y compris les nerfs rachidiens, eût fait défaut complètement et il eût été impossible de connaître l'origine des cellules de Schwann.

4) Greffes orthotopiques de crête neurale marquée.

(28 cas de greffes bilatérales et 10 cas de greffes unilatérales). Sur ces 38 cas, 29 ont comporté la greffe des crêtes neurales sur toute la longueur du tronc.

Les larves opérées ont été fixées au stade 38 (13 cas), et aussi dans les stades plus jeunes, afin qu'une formation éventuellement plus précoce de cellules de Schwann à partir de la crête neurale puisse être décelée : 25 larves ont été fixées entre le stade 22 (bourgeon caudal) et le stade 37 (percement de la bouche), à raison de 1 ou 2 larves à chaque stade.

— Larves au stade 38 : les 13 larves présentent des cellules de Schwann marquées ; mais leur nombre par rapport au nombre total des cellules de Schwann est faible. Il est de l'ordre de 1 cellule marquée pour 15 ou 20 cellules non marquées. De plus leur marquage est généralement bien moins intense que celui des cellules des ganglions rachidiens ou de la partie dorsale de la moelle épinière.

— Larves fixées avant le stade 30 (trois paires de bourgeons branchiaux saillants) : 9 cas. Le marquage de la moelle épinière et du mésenchyme est abondant et intense, mais les ganglions rachidiens ne sont pas individualisés et les tissus sont encore peu différenciés. Les cellules marquées isolées sont nombreuses autour de la moelle épinière et de la chorde dorsale, mais on ne peut reconnaître à quel type cellulaire elles appartiennent, ni préjuger de leur différenciation ultérieure.

— Larves fixées entre le stade 30 et le stade 37 : 16 cas. Ce sont ces larves qui s'avèrent les plus intéressantes. A partir du stade 31 les ganglions rachidiens sont bien reconnaissables, et à partir du stade 32 on peut suivre le trajet des nerfs rachidiens. Ils sont, dès ce moment, entourés de très nombreuses cellules de Schwann dont le noyau, aplati et allongé, est bien reconnaissable. Ces cellules de Schwann sont marquées, et leur marquage est intense. A partir du stade 32, le nombre des cellules de Schwann marquées augmente constamment, tandis que l'intensité de leur marquage s'affaiblit. Jusqu'au stade 35, toutes les cellules de Schwann sont marquées. A partir du stade 35 apparaissent en grand nombre des cellules de Schwann non marquées, tandis que des cellules marquées sont toujours présentes mais avec un marquage qui s'affaiblit progressivement. Il y a donc à partir de ce stade deux catégories de cellules de Schwann : celles qui sont marquées et qui dérivent de la crête neurale greffée, et celles qui ne sont pas marquées, dont l'origine ne saurait être que le tube nerveux lui-même, dans ses parties latérales ou ventrale. Il faut toutefois s'assurer que ces cellules non marquées ne dérivent pas également de la crête neurale, et que leur absence de marquage n'est pas le résultat d'une succession particulièrement rapide de mitoses, au cours desquelles le marquage initial se serait dilué au point de devenir indétectable.

Nous avons, dans ce but, effectué l'opération inverse en marquant non plus la crête neurale mais le tube nerveux, et en réalisant séparément, dans deux séries opératoires, le marquage soit de la partie ventrale, soit des parties latérales de la moelle épinière.

5) Greffes orthotopiques de moelle épinière marquée.

La moitié ventrale du tube nerveux a été marquée chez 26 larves, en réalisant au stade neurula ouverte la substitution du territoire présomptif ventral de la moelle épinière par un territoire identique provenant d'une neurula marquée. Cette opération est délicate, car il faut se garder de léser le territoire chordal sous-jacent.

Les coupes montrent que la moelle épinière est souvent déformée. Le tube nerveux s'est mal refermé et ses sections ne sont pas toujours circulaires. Dans la moitié des cas, la moelle épinière est normale et marquée dans sa moitié ventrale, tandis que ni la moitié dorsale, avec les cellules de Rohon-Béard, ni les ganglions rachidiens ne sont marqués. Dans 6 cas seulement, on trouve des cellules de Schwann marquées, chez des larves aux stades 37 ou 38. Ces cellules marquées sont relativement peu nombreuses, par comparaison avec le nombre total de cellules de Schwann, mais leur marquage est intense et atteste qu'elles sont issues de la partie ventrale du tube nerveux.

Ce résultat confirme celui qui a été obtenu grâce au marquage de la crête neurale : à partir du stade 35 (stade de l'éclosion), des cellules de Schwann se détachent de la moelle épinière et viennent se localiser dans les nerfs rachidiens qui, à ce moment, possèdent déjà en grand nombre des cellules de Schwann issues des crêtes neurales.

Dans 11 cas, ce sont les parties latérales de la moelle épinière qui ont été marquées, par une substitution au stade neurula de leurs territoires présomptifs par des greffons orthotopiques prélevés sur des neurulas marquées. Dans 2 cas seulement cette opération a pu être réalisée en respectant intégralement à la fois les crêtes neurales et la partie ventrale du tube nerveux présomptif : elle est extrêmement difficile, en raison de la longueur et de l'étroitesse du greffon à implanter. Dans les 9 autres cas, on a greffé à la fois la partie latérale du tube nerveux présomptif et la crête neurale adjacente. Dans ces conditions, le greffon est plus large, et plus facile à manipuler.

Dans les 2 cas où l'opération intéressait exclusivement les bandes latérales du tube nerveux présomptif, aucune cellule de Schwann n'est marquée, alors que le marquage des parties latérales de la moelle épinière est bien net. Dans les 9 cas où l'opération intéressait à la fois les crêtes neurales et les bandes latérales du tube nerveux présomptif, toute la moelle épinière est marquée, sauf sa partie ventrale ; les ganglions rachidiens sont également marqués, de même que le mésenchyme environnant. On trouve des cellules de Schwann

marquées mais, compte-tenu du stade de fixation, leur abondance est tout-à-fait du même ordre que celle que nous avons observée après les greffes de crêtes neurales marquées seules.

6) Discussion.

Ces séries expérimentales établissent que l'origine des cellules de Schwann est, en réalité, complexe. Une première génération, à partir du stade 31, est issue de la crête neurale : ces cellules se multiplient ensuite comme le montrent concurremment l'augmentation de leur nombre et la diminution de leur marquage ; après le stade 38, leur marquage est devenu très faible ou nul, et il est alors impossible de les distinguer des cellules de Schwann de la deuxième génération, issues de la moelle épinière. Le marquage des différentes parties de la moelle épinière a montré que c'est la partie ventrale de celle-ci qui est à l'origine des cellules de Schwann de cette deuxième génération, visible à partir du stade 35 et ensuite prépondérante, puisque, au stade 38, les cellules de la première génération sont déjà beaucoup moins nombreuses que celles de la deuxième génération.

L'origine double des cellules de Schwann se trouve ainsi démontrée. Les expériences d'ablations ne nous avaient pas permis de dégager cette conclusion, puisque dans chaque cas des cellules de Schwann étaient toujours présentes. On a ainsi mis en évidence, dans les conditions normales, des phénomènes successifs qui, dans toutes les autres conditions expérimentales, sont perturbés et impossibles à distinguer. Nous pouvons cependant retenir des expériences d'ablations que de larges possibilités de suppléance existent entre la crête neurale et la partie ventrale de la moelle épinière, puisque, quelles que soient les ablations réalisées, le nombre des cellules de Schwann n'est pas diminué. C'est cette fois encore une régulation qui se réalise, non plus au sein de la crête neurale seule, comme nous en avons vu déjà de nombreux exemples, mais entre la crête neurale et un autre territoire embryonnaire qui est ici la partie ventrale de la moelle épinière.

La première génération, issue de la crête neurale, est passée inaperçue des auteurs qui ont étudié leurs animaux opérés à des stades trop tardifs et ne disposaient pas d'une méthode qui permît de distinguer, à coup sûr, des cellules identiques, mais d'origines différentes. Harrison cependant (1924) avait envisagé la possibilité de cette double origine. Triplett (1958) avait remarqué que chez les Anoures les cellules de Schwann ont cette double origine, et que le nombre des cellules de chaque origine était différent suivant le stade de développement considéré.

De la sorte, les divergences que nous avions constatées s'expliquent aisément : nous avons retrouvé de quelque manière les résultats des uns et des autres, en constatant la présence des cellules de Schwann malgré l'ablation des crêtes neurales, et malgré l'ablation de la partie ventrale du tube nerveux ; grâce au marquage nucléaire

nous avons pu démontrer que ces deux territoires sont bien à l'origine des cellules de Schwann, et interviennent successivement, avec des possibilités illimitées de suppléance réciproque.

V. — Cellules pigmentaires.

Nous étudierons ici le cas des cellules pigmentaires du tronc : il s'avère en effet différent, à plusieurs égards, de celui des cellules pigmentaires de la tête. Leur origine est bien connue : elles sont issues de la crête neurale. Les ablations des crêtes neurales troncales et la mise d'explants en culture apportent des renseignements qui n'étaient pas apparus dans notre étude des cellules pigmentaires de la tête.

1) Ablations de la crête neurale troncale.

Les ablations unilatérales, même si elles intéressent toute la longueur du tronc, sont sans effet sur les cellules pigmentaires : même dans les stades les plus jeunes, la pigmentation des larves opérées apparaît et évolue d'une façon normale.

Les ablations bilatérales, au contraire, produisent de spectaculaires modifications de la pigmentation, à condition qu'elles atteignent une longueur égale au moins au tiers ou au quart de la longueur du tronc. Si la longueur des ablations est suffisante, on voit dès le stade 31 que la région opérée ne possède pas de nageoire dorsale, et est totalement dépourvue de cellules pigmentaires (Pl. I, fig. 1). Dans les jours qui suivent, on assiste à la migration vers la région opérée de cellules pigmentaires qui se sont différenciées dans les régions adjacentes à l'opération : c'est ainsi qu'au stade 38 (Pl. I, fig. 3) quelques cellules pigmentaires sont présentes dans la région opérée au voisinage du territoire normalement pigmenté. Ce processus de migration de cellules issues des régions voisines se poursuit régulièrement de proche en proche, et a pour résultat que la région opérée est progressivement repeuplée en cellules pigmentaires : si la région opérée est assez courte (moins de 1/4 de la longueur du tronc), cette colonisation reconstitue une pigmentation entièrement normale dans la région opérée dès le stade 42.

Si l'opération a été pratiquée sur une grande longueur, la région opérée ne peut être entièrement colonisée par les cellules pigmentaires des régions voisines, de sorte que la plus grande partie du tronc de la larve n'est pas pigmentée (Pl. I, fig. 2). Cet état toutefois ne peut être étudié aussi longtemps qu'il serait souhaitable, car dans tous les cas où nous avons réussi à obtenir des larves encore entièrement dépourvues de tout chromatophore troncal au stade 38, les larves ne se sont pas alimentées.

Plusieurs cas cependant se sont révélés d'un grand intérêt : 7 larves qui avaient subi l'ablation totale bilatérale des crêtes neurales troncales, ont pu s'alimenter : elles n'étaient pas totalement dépigmentées et possédaient une nageoire dorsale plus ou moins incom-

plète, ce qui atteste que l'ablation des crêtes neurales n'avait pas été rigoureusement totale. Ces larves ont été élevées jusqu'à la métamorphose et on a pu suivre, durant toute la vie larvaire, la migration des cellules pigmentaires depuis les régions pigmentées vers les régions dépigmentées : peu à peu les régions dépigmentées ont été colonisées et ont acquis un aspect normal. Cependant chez trois de ces larves des régions partiellement dépigmentées ont subsisté jusqu'à la métamorphose : c'est le cas de la larve M 14 (Pl. I, fig. 4). Dans ces trois cas la distribution normale des cellules pigmentaires n'a pu être entièrement restaurée : les possibilités de migration des cellules pigmentaires sont très grandes, mais insuffisantes dans ces cas extrêmes.

De tels résultats s'opposent à ceux que nous avions obtenus dans la région céphalique, où jamais nous n'avons observé de région dépigmentée : la tête est en effet beaucoup plus courte que le tronc, et peut toujours être recolonisée par les cellules pigmentaires des régions voisines.

Il ne s'agit pas en ce cas d'une migration directe des cellules de la crête neurale vers les régions opérées, mais d'une migration plus tardive de cellules qui avaient déjà atteint les régions de la larve qu'elles colonisent normalement, et qui migrent à nouveau, dans une direction inusitée. Cette migration secondaire, s'effectue sans doute selon le mécanisme découvert par Twitty et Niu (1954), et qui se manifeste par la tendance des cellules pigmentaires à se disperser et à s'éloigner les unes des autres.

2) Greffes hétérotopiques de crête neurale céphalique (12 cas).

Sur aucune des larves issues des neurulas ainsi opérées, on n'a observé de régions dépigmentées. La crête céphalique greffée a produit des cellules pigmentaires, comme la crête troncale en produit elle-même.

3) Greffes orthotopiques de crête neurale marquée.

Les observations portent sur 38 cas, dont 28 opérations bilatérales sur toute la longueur du tronc. Les larves issues de ces opérations ont été fixées à tous les stades, depuis le stade bourgeon caudal (st. 22) jusqu'au stade 38. Cette période est celle de la migration des cellules de la crête neurale, de la différenciation et de la multiplication des chromatophores.

Dans ce cas particulier des cellules pigmentaires, l'interprétation des autoradiographies est un peu délicate : en effet les chromatophores ne peuvent être reconnus comme tels que lorsqu'ils ont commencé à produire du pigment. Inversement, lorsque les cellules pigmentaires, et tout spécialement les mélanophores, sont bien différenciées, la richesse de leur cytoplasme en grains de mélanine est telle qu'il devient presque impossible de distinguer s'ils sont marqués, les grains de pigment et les grains d'argent étant presque de la même taille. Cette distinction, malaisée au premier abord, est cependant possible : les grains de mélanine sont d'un noir un peu brun

et contenus dans le cytoplasme, alors que les grains d'argent manifestant le marquage de la cellule sont contenus dans l'émulsion photographique, donc dans un plan différent de celui de la coupe histologique, et sont absolument noirs. C'est entre ces deux extrêmes, au début de la différenciation des cellules pigmentaires, que l'observation en est la plus facile : les grains de mélanine sont présents, mais peu abondants ; ils permettent d'identifier à coup sûr le jeune mélanoblaste, et laissent voir aisément son marquage.

Pour l'examen des stades plus âgés, nous avons eu recours à la méthode d'observation en lumière réfléchie, au moyen des objectifs Leitz « Ultropak », que nous avons décrite précédemment. La distinction entre le pigment et le marquage est alors manifeste. Ce dispositif nous a permis de reconnaître le marquage des chromatophores âgés avec une sûreté absolue (Pl. IV, fig. 37).

Tous les cas de greffes orthotopiques de crête neurale marquée montrent que les chromatophores sont marqués. Ils sont situés sous l'épiderme et au plafond de la cavité générale : on distingue immédiatement le noyau, d'un blanc éclatant, et le pigment noir contenu dans le cytoplasme.

4) Culture d'explants.

Nous avons mis en culture, en utilisant les mêmes techniques que pour la crête céphalique, 68 explants de crête troncale. L'évolution des explants est exactement la même que dans le cas de la crête céphalique.

La moitié des explants ont été prélevés dans la partie antérieure du tronc et l'autre moitié dans la partie postérieure. Leur comportement a été identique. La forme sphérique parfaite est acquise dès le 2e jour : les mélanophores apparaissent le 5e ou le 6e jour (à 20°C) ; leur nombre et leur richesse en pigment augmentent jusqu'au 11e ou 12e jour, puis, vers le 15e jour, l'explant se cytolyse.

On n'a pas observé la différenciation de xanthophores ni de guanophores ; seuls les mélanophores se sont différenciés.

5) Greffes de crête neurale sur la face ventrale de neurulas.

Nous avons déjà fait remarquer qu'au cours du développement embryonnaire et larvaire, la face ventrale reste longtemps dépourvue de cellules pigmentaires : on peut donc mettre à profit l'existence de cette région temporairement non pigmentée pour y implanter des fragments de crête neurale et y étudier leur différenciation.

10 opérations de ce type ont été réalisées au stade neurula ; 5 ont porté sur des greffons troncaux antérieurs, et 5 sur des greffons troncaux postérieurs. Dès le 6e jour des mélanophores apparaissent dans le greffon, et dans les jours suivants ils se dispersent aux alentours du greffon, sous l'épiderme et sur l'intestin (Pl. I. fig. 5). Le 10e jour, le greffon devient jaune, du fait de la différenciation des xanthophores, et le 15e jour les premiers guanophores apparaissent. Jusqu'au 25e jour la pigmentation de la face ventrale devient de

plus en plus intense par l'augmentation du nombre des chromatophores de chaque type. Mais à partir de ce moment, la face ventrale étant colonisée par les chromatophores venus des régions latérales de la larve, on ne peut plus distinguer les chromatophores issus du greffon de ceux qui sont normalement présents chez la larve à partir de ce stade.

Les mélanophores et les guanophores apparaissent donc ici un peu plus tard, et les xanthophores un peu plus tôt que dans le cas des greffons d'origine céphalique, alors que chez les larves témoins les mélanophores apparaissent d'abord dans le tronc et un jour plus tard dans la tête. Ces légères différences attestent que la peau de la région ventrale permet la différenciation des chromatophores, mais un peu différemment de la peau des autres régions du corps, seules pigmentées dans les stades jeunes.

Ces expériences montrent, une fois de plus, que les cellules pigmentaires du tronc sont issues de la crête neurale troncale : les ablations, le marquage par la thymidine tritiée, la culture d'explants et les greffes de crête troncale sur la face ventrale de neurulas le démontrent. Les cellules pigmentaires manifestent un pouvoir de migration et de régulation considérable, puisque dans presque tous les cas expérimentaux une pigmentation normale de la larve se rétablit. Inversement, l'implantation de crête neurale dans la région ventrale est suivie de la présence précoce de cellules pigmentaires dans cette région : ces cellules pigmentaires peuvent s'y différencier, coloniser des organes qui, comme l'intestin, en sont normalement dépourvus et y subsister durant toute la vie de l'individu, même après la métamorphose. Les cultures d'explants ne permettent pas la différenciation de tous les types de chromatophores.

La crête troncale se révèle homogène : elle possède d'un bout à l'autre les mêmes potentialités pour la formation des chromatophores, alors que la crête céphalique présente une spécialisation régionale, puisque les guanophores sont produits en beaucoup plus grand nombre par la région antérieure.

VI. — Mésenchyme et méninges.

Le tissu mésenchymateux constitue un tissu d'emballage lâche, qui entoure la chorde dorsale, sépare la peau des masses musculaires, et constitue le soutien de la nageoire dorsale et de la nageoire caudale (Pl. IV, fig. 30). Il existe en toutes les régions où il remplit les vides entre les organes.

Les méninges sont des enveloppes du système nerveux ; on distingue classiquement vers l'extérieur la pachyméninge ou dure-mère, et vers l'intérieur la leptoméninge, elle-même subdivisée en pie-mère, feuillet cellulaire directement appliqué sur le tissu nerveux, et arachnoïde, tissu très lacuneux situé entre la pie-mère et la dure-mère.

Oberling (1922) avance l'hypothèse que les méninges, et particulièrement la leptoméninge, sont l'homologue de la gaine des nerfs

et sont dérivées de la crête neurale. Flexner (1929) conclut que chacune des méninges a une origine complexe. Raven (1936) précise que la majorité des cellules de la leptoméninge sont dérivées de la crête neurale, tandis que la majorité des cellules de la pachyméninge sont d'origine endomésodermique.

1) Ablations des crêtes neurales troncales.

Les ablations bilatérales totales entraînent, dans les cas où la cicatrisation se produit d'une manière satisfaisante, l'absence totale de la nageoire dorsale ; cependant la queue possède une nageoire caudale normale (Pl. I, fig. 2). Les ablations bilatérales moins longues entraînent la présence d'échancrures dans la nageoire dorsale : la région opérée ne possède pas de nageoire dorsale, alors que les régions voisines en sont pouvues (Pl. I, fig. 3). Les coupes montrent une extrême réduction du mésenchyme : la nageoire dorsale est absente, et le mésenchyme situé autour des masses musculaires est très réduit ou absent, au point que les masses musculaires droite et gauche ne sont plus séparées par une zone de tissu mésenchymateux, et se soudent l'une à l'autre formant ainsi un large pont transversal au-dessus du tube nerveux (Pl. IV, fig. 31).

Les méninges entourant la moelle épinière sont extrêmement réduites : l'arachnoïde a disparu et une seule couche de cellules aplaties sépare la moelle épinière des somites. L'ablation des crêtes neurales produit donc d'importantes modifications : la réduction massive du tissu mésenchymateux a pour conséquence l'absence de la nageoire dorsale, la soudure des masses somitiques dans le plan médian, et la réduction des méninges à une seule couche cellulaire.

2) Greffes orthotopiques de crête neurale marquée (42 cas).

Dès les tout premiers stades (st. 24) on voit des cellules marquées se disperser dans la région dorsale et dans les flancs des embryons : ces cellules ne sont pas différenciées et on ne peut connaître leur différenciation ultérieure. A partir du stade 34-35, on peut reconnaître des cellules mésenchymateuses marquées. Au stade 38 la nageoire dorsale est bien développée : son épithélium et son mésenchyme sont marqués (Pl. IV, fig. 38). Dans tous les cas on obtient en grande abondance du tissu mésenchymateux marqué.

Dans les méninges, les cellules marquées sont le plus souvent appliquées contre le tissu nerveux (pie-mère) ou situées dans les espaces arachnoïdiens ; mais on en trouve également contre les somites (dure-mère). Au stade 38, la distinction entre les cellules des méninges et les cellules des ganglions rachidiens reste dans beaucoup de cas hasardeuse, et nous ne pouvons donner des pourcentages précis de cellules marquées dans chacune des méninges, celles-ci étant encore trop minces et trop lâches à ce stade. Chacune d'elles comporte des cellules marquées, et dérive donc, au moins pour une part, de la crête neurale.

En outre, 9 cas de greffes hétérotopiques unilatérales de crête céphalique en position troncale ont été réalisés : les larves opérées possèdent une nageoire dorsale normale et les autoradiographies montrent que les cellules mésenchymateuses marquées sont très abondantes dans la nageoire dorsale et la partie dorsale des larves. La crête céphalique produit donc du mésenchyme dans le tronc aussi bien que dans la tête.

Le mésenchyme issu de la crête neurale est très abondant dans la partie dorsale de l'embryon où il constitue en particulier la nageoire dorsale ; il l'est beaucoup moins dans la partie ventrale qui reçoit la plus grande partie de ses cellules mésenchymateuses du mésoderme. C'est pour distinguer ces deux tissus mésenchymateux d'origines différentes que les auteurs, à la suite de Platt (1893, 1897), emploient le terme de mésectoderme ou, mieux, d'ectomésenchyme, pour désigner le mésenchyme issu de la crête neurale, dont l'origine est ectodermique et non mésodermique.

La crête neurale est donc à l'origine de tout le mésenchyme dorsal et latéral des larves, et d'une partie seulement des méninges : les cellules des méninges ont une double origine : d'une part la crête neurale, et d'autre part, selon les auteurs que nous avons cités, le mésoderme.

VII. — Ganglions sympathiques et cellules chromaffines.

L'origine du système nerveux sympathique a fait l'objet de nombreux travaux dont les conclusions sont quelque peu contradictoires :

— le premier groupe de travaux conclut que les ganglions sympathiques se forment *in situ* par condensation du mésenchyme (Bruni, 1915 ; Camus, 1912 ; Alcala, 1934 ; Levi-Montalcini, 1947).

— le deuxième groupe affirme qu'ils se forment à partir de cellules migratrices venues de la partie ventrale de la moelle épinière (Kuntz et Batson, 1920 ; Kuntz, 1922 ; Jones, 1937, 1939, 1941 ; Piatt, 1951).

— d'après le troisième groupe, ils sont issus de cellules migratrices provenant de la crête neurale (His, 1897 ; Müller et Ingvar, 1923 ; van Campenhout, 1930 a et b ; Detwiler, 1937 ; Yntema et Hammond, 1947).

— enfin Raven (1937) leur assigne une origine mixte, à la fois la crête neurale et la moelle épinière.

Ces divergences résultent vraisemblablement de trois facteurs : tout d'abord, on ne possédait pas de moyen sûr pour marquer des cellules migratrices ; ensuite le facteur chronologique n'a sans doute pas été suffisamment pris en considération ; enfin, selon Triplett (1958), il se pourrait que des différences existent effectivement entre les diverses espèces étudiées.

Les cellules chromaffines sont connues depuis longtemps grâce à la réaction chromaffine qui permet de les colorer dès qu'elles sont physiologiquement actives, l'adrénaline ou, d'une manière plus générale, les catécholamines qu'elles produisent, ayant une affinité particulière pour les sels de chrome.

En fait, il est certain depuis le travail de Caston (1962) que l'activité physiologique des cellules chromaffines débute bien avant que la réaction chromaffine ne devienne positive : par des dosages biochimiques cet auteur a montré que des catécholamines sont présentes chez *Rana* dès le stade neurula. La réaction chromaffine ne permet l'identification histologique de ces cellules que lorsque leur richesse en catécholamines devient grande, à des stades avancés du développement.

Balfour (1878) émit le premier l'hypothèse que les cellules chromaffines ont la même origine que le système nerveux sympathique, et il désigna sous le nom de « sympathogonies » les cellules qui seraient à l'origine du système nerveux sympathique et des cellules chromaffines. Il ne précise pas toutefois leur origine. Cette conception a été reprise par Kohn (1902), Pawlikowski (1934 a et b) et Boyd (1960), mais ces auteurs n'ont pas recherché l'origine des sympathogonies. Les travaux expérimentaux de Van Campenhout (1930 b) chez les Amphibiens et de Hammond et Yntema (1947) chez le poulet montrent que, après ablation des crêtes neurales troncales, le système sympathique et les cellules chromaffines sont absentes. L'hypothèse de Balfour se trouve ainsi renforcée : les cellules chromaffines ont la même origine que le système nerveux sympathique.

Nous nous sommes proposé de reprendre l'étude de cette question en utilisant, en plus des méthodes classiques, la méthode de marquage nucléaire qui nous a déjà permis de reconnaître avec certitude l'origine de plusieurs tissus ou organes dont la formation restait controversée.

1) Le système nerveux sympathique et les cellules chromaffines chez les témoins.

Ces deux types d'organes ne peuvent être reconnus histologiquement avec certitude qu'à partir du stade 55 b, c'est-à-dire lorsque la métamorphose est en cours : c'est alors seulement que les larves montrent de place en place, le long de l'aorte dorsale, de petits groupes de cellules ganglionnaires qui sont la première manifestation des ganglions sympathiques (Pl. V, fig. 43). La réaction chromaffine devient positive au même moment dans des cellules assez dispersées, situées toujours dans la paroi ou à proximité immédiate de la veine cave inférieure ou des veines parcourant la surface du mésonéphros ; leur noyau est généralement très granuleux, et leur cytoplasme coloré en jaune-brun par la réaction chromaffine est de forme plus ou moins étoilée. Elles sont distribuées tout le long des mésonéphros et même un peu en avant de ceux-ci. Elles sont plus nombreuses dans la région postérieure du tronc (Pl. V, fig. 44 et 45).

La fig. 19 présente des schémas montrant la distribution des ganglions sympathiques et des cellules chromaffines chez des témoins aux stades 55 b (début de la métamorphose), 55 c, et 56 (métamorphose achevée).

Fig. 19. — Disposition des ganglions rachidiens et des ganglions sympathiques chez des larves témoins aux stades 55 b, 55 c, et 56. Les cellules chromaffines n'ont été représentées que pour le stade 55 c, qui est le stade atteint par les animaux opérés représentés à la fig. 20 (au stade 55 b, l'identification des cellules chromaffines est difficile). Les flèches horizontales indiquent le niveau de l'extrémité antérieure du mésonéphros. Les ganglions rachidiens sont représentés par des ovales, les ganglions sympathiques par de petits ronds blancs, et les groupes de cellules chromaffines par des points noirs (groupes de 3 à 5 cellules en moyenne).

Un délai d'apparition aussi long (jusqu'à l'âge de 3 mois environ) rend inopérante la méthode de marquage nucléaire. La radioactivité des noyaux marqués diminue en effet de moitié à chaque mitose, et le nombre de mitoses entre le stade neurula et la métamorphose est beaucoup trop élevé pour qu'il subsiste, dans les noyaux d'une larve de 3 mois, une quantité détectable de radioactivité. Il est impossible de faire durer le marquage des noyaux jusqu'à un stade aussi tardif, car il faudrait employer une dose de radioactivité incompatible avec la vie des cellules. Malgré cette limitation, nous verrons que le marquage nucléaire de la crête neurale a apporté des informations précieuses.

2) Ablations bilatérales des crêtes neurales troncales.

Afin de réduire le plus possible les phénomènes de régulation, nous n'avons réalisé en vue de la présente étude que des ablations totales et bilatérales des crêtes neurales troncales. Nous avons déjà eu l'occasion précédemment de dire qu'après de telles opérations la cicatrisation ne se produit d'une manière satisfaisante que dans un très petit nombre de cas. Nous avons cependant conservé cette méthode opératoire, car les ablations partielles de crête neurale sont suivies d'une régulation plus ou moins complète. Nous avons réalisé 170 opérations d'ablations bilatérales totales des crêtes troncales. 30 larves ont survécu, et atteint le stade 38. Plusieurs étaient parfaitement rectilignes, entièrement dépourvues de nageoire dorsale et de chromatophores troncaux ; mais seules se sont alimentées sept larves qui présentaient une nageoire dorsale incomplète et une pigmentation partielle. L'aspect de ces sept larves indiquait que l'ablation des crêtes neurales n'avait pas été absolument complète, et que de petits fragments de celles-ci avaient été laissés en place.

Ces sept larves sont les seules à avoir permis l'étude de la répartition des ganglions sympathiques et des cellules chromaffines à l'époque de la métamorphose. A la métamorphose trois d'entre elles seulement présentaient encore de petites régions incomplètement pigmentées. Par contre, la nageoire dorsale a conservé durant toute la vie larvaire le même développement. On avait pris soin de noter, pour chaque larve, l'aspect de la nageoire dorsale car les régions qui en sont dépourvues sont celles où, nous le savons, l'ablation des crêtes neurales avait bien été totale.

2 larves ont été fixées au stade 55 b : à ce moment chez les témoins les ganglions sympathiques et les cellules chromaffines peuvent être identifiés avec certitude pour la première fois, et 5 ont été fixées au stade 55 c, stade auquel ces organes sont mieux différenciés. Elles mesuraient entre 48 et 57 mm de longueur totale seulement (témoins : 60-65 mm). On a étudié pour chaque animal la répartition des ganglions rachidiens, des ganglions sympathiques, des cellules chromaffines, et noté la position du mésonéphros, dont la limite antérieure a été choisie comme point de référence dans les diagrammes. Enfin on a représenté pour chaque cas le développement de la nageoire dorsale, tel qu'il se présentait avant la métamorphose. Les résultats sont rassemblés sur les diagrammes de la fig. 20.

On voit que dans chaque animal de longues régions sont totalement dépourvues de ganglions rachidiens : dans ces régions, la nageoire dorsale est soit absente, soit très réduite. Ces deux faits attestent qu'en ces régions les crêtes neurales avaient bien été totalement excisées : il est alors remarquable de constater que ces régions sont aussi totalement dépourvues de ganglions sympathiques et de cellules chromaffines. Les cas M 13 et M 14 sont à cet égard particulièrement révélateurs.

L'examen détaillé des diagrammes appelle un certain nombre de remarques :

Chez les animaux témoins (fig. 19) la nageoire dorsale était continue, les ganglions rachidiens sont régulièrement échelonnés le long du tronc, les ganglions sympathiques s'étendent tout le long du tronc sauf dans la partie tout-à-fait antérieure, et sont plus nombreux dans la région moyenne et dans la région postérieure ; enfin les cellules chromaffines sont abondantes dans les deux derniers tiers du tronc, et plus particulièrement dans le dernier tiers.

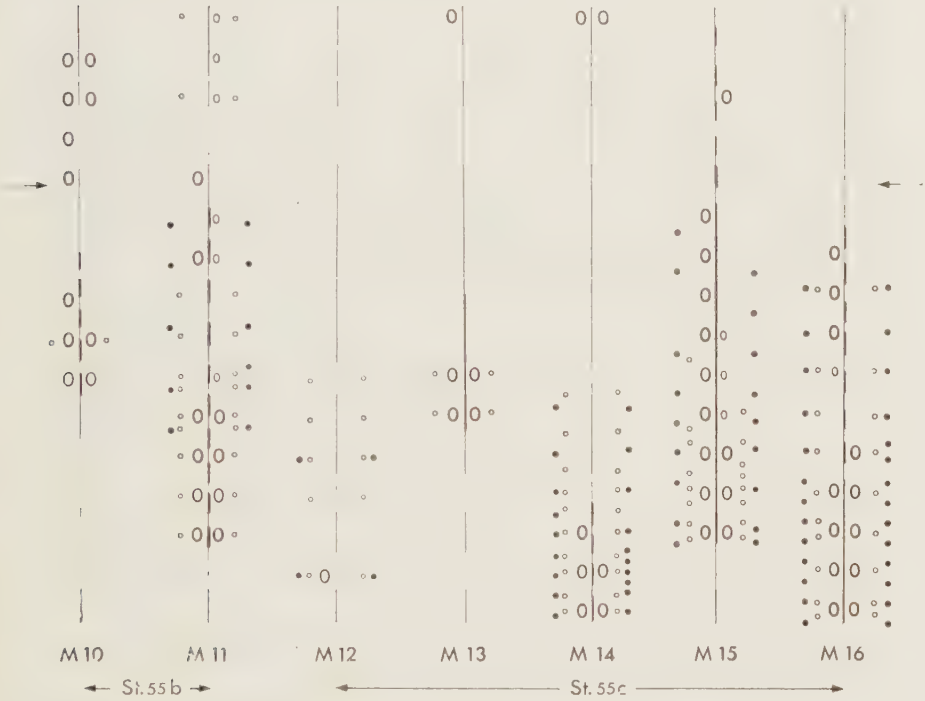

Fig. 20. — Disposition des ganglions rachidiens, des ganglions sympathiques et des cellules chromaffines chez 7 animaux opérés (mêmes signes conventionnels qu'à la figure 19). Les ganglions rachidiens de taille réduite sont représentés par des ovales plus petits. (La présence de la nageoire dorsale avant la métamorphose est représentée par un trait épais continu dans les régions où la nageoire était bien développée, par un trait épais discontinu dans les régions où elle était peu développée ; il n'y a pas de trait épais dans les régions qui étaient dépourvues de nageoire dorsale).

Chaque animal possède une région plus ou moins longue totalement dépourvue de ganglions rachidiens, de ganglions sympathiques, de cellules chromaffines et de nageoire dorsale.

Chez les animaux opérés, les dérivés de la crête neurale déjà connus comme tels (nageoire dorsale, ganglions rachidiens) sont, dans l'ensemble, présents ou absents simultanément. Cependant on trouve

(M 10 et M 11) quelques ganglions rachidiens en l'absence de la nageoire dorsale. Par ailleurs, on peut trouver (M 12 et M 14) des segments qui sont dépourvus de ganglions rachidiens et de nageoire dorsale, mais qui possèdent des ganglions sympathiques et des cellules chromaffines ; dans ces 2 cas les ganglions sympathiques pénètrent plus loin dans la région privée de ganglions rachidiens que les cellules chromaffines : dans le cas M 15 au contraire, les cellules chromaffines sont présentes dans des segments dépourvus de ganglions sympathiques. Ces situations résultent d'une migration plus ou moins longue des cellules ganglionnaires ou des cellules chromaffines à partir des régions incomplètement privées de crête neurale.

Les ganglions sympathiques et les cellules chromaffines sont étroitement liés, et font défaut ensemble dans les régions où les dérivés connus de la crête neurale font eux-mêmes défaut. Cependant ils peuvent être présents sur une certaine longueur en l'absence des autres dérivés de la crête neurale, si ceux-ci sont présents dans leur voisinage immédiat : cette disposition se comprend très bien si on se rappelle une fois encore les capacités de migration des cellules issues de la crête neurale, en direction ventrale, mais aussi en direction antérieure ou postérieure.

Nous pouvons donc conclure que les ganglions sympathiques et les cellules chromaffines sont issus de la crête neurale. Si leur origine était autre, ils seraient présents dans les régions dépourvues des dérivés de la crête neurale, disposition qui ne se rencontre pas dans les larves opérées. Nous pensons que le pouvoir de migration des cellules issues de la crête neurale suffit à expliquer leur présence éventuelle dans les régions voisines de celles qui possèdent ces dérivés de la crête neurale, et suffit également à expliquer les résultats de Kuntz (1922) et de Jones (1941) qui, après ablation trop courte des crêtes neurales, observent la présence de ganglions sympathiques dans la région opérée.

Nos résultats confirment ceux de Müller et Ingvar (1923), van Campenhout (1930), Detwiler, (1937), et Yntema et Hammond (1947), et partiellement ceux de Raven (1937).

3) Greffes orthotopiques des crêtes neurales troncales marquées.

18 cas étudiés à partir du stade 36 : les cellules marquées se trouvent dans tous les tissus ou organes déjà étudiés, mais aussi au voisinage de l'aorte, le plus souvent contre les uretères primaires ; ce sont des cellules isolées, ou groupées par 2 ou 3, dont le noyau est volumineux et arrondi (Pl. V, fig. 41 et 42). Il ne peut s'agir de cellules appartenant aux tissus déjà étudiés. La situation de ces cellules est rigoureusement celle des futurs ganglions sympathiques, qui ne se formeront que beaucoup plus tard, exactement à cet emplacement. Raven avait déjà remarqué la présence de cellules issues de la crête neurale en ce point, et les avait considérées

comme les cellules qui donneront les ganglions sympathiques. Nous partageons cette manière de voir et pensons que ces cellules sont les « sympathogonies » dont Balfour avait supposé l'existence et qui sont à l'origine, à la fois, des ganglions sympathiques et des cellules chromaffines. Toutefois les résultats de Caston conduisent à penser qu'une partie au moins des futures cellules chromaffines sont déjà fonctionnelles à ce stade. Le marquage nous permet de voir qu'elles sont mises en place très tôt ; à la métamorphose elles sont déjà différenciées suivant deux voies différentes et se multiplient activement. Jusqu'au stade 42 inclusivement leur marquage reste visible.

Nous possédons avec ces larves le maillon jeune qui nous manquait pour reconstituer l'histoire complète de la formation des ganglions sympathiques : les deux méthodes expérimentales que nous avons utilisées dans cette recherche s'avèrent complémentaires et permettent de suivre toute l'évolution des sympathogonies issues de la crête neurale ; elles se mettent en place précocement (avant le stade 36) en dessous de l'aorte dorsale, au voisinage immédiat des uretères primaires ; ce sont de grosses cellules peu nombreuses et dispersées. Elles se multiplient peu jusqu'au stade 42 ; à la métamorphose elles sont différenciées dans deux voies différentes et donnent naissance, d'une part aux ganglions sympathiques, d'autre part aux cellules chromaffines.

Le marquage nucléaire de la crête neurale nous a permis de mettre en évidence la première phase de ces phénomènes.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

Les études antérieures avaient montré le grand nombre et la diversité des organes que forme ou contribue à former la crête neurale. Cette ébauche embryonnaire si précocement mise en place est à l'origine de types cellulaires très divers : après avoir migré au milieu des autres cellules d'une manière définie mais cependant modifiable, ses cellules se différencient dans des voies nombreuses et très différentes.

Plusieurs problèmes restaient posés à propos des capacités morphogénétiques de la crête neurale : la richesse de ses capacités avait été peu à peu reconnue, mais sur plusieurs points il n'existait pas entre les auteurs une unité de vues satisfaisante, et des controverses restaient ouvertes quant au rôle joué par la crête neurale dans la formation des dents, des ganglions crâniens, de l'encéphale antérieur, des cellules de la gaine de Schwann, des méninges, des ganglions sympathiques et des cellules chromaffines. L'étendue des phénomènes de régulation au sein de la crête neurale n'était pas précisée, et on ne savait pas dans quelle mesure la crête neurale est ou non homogène, c'est-à-dire si elle possède ou non dans toutes ses parties les mêmes potentialités.

Grâce surtout à la technique nouvelle de marquage nucléaire par la thymidine tritiée, notre travail nous a permis de confirmer les points déjà établis, tout en apportant dans plusieurs cas des précisions nouvelles, et de résoudre des problèmes qui restaient posés.

— La crête neurale céphalique est régionalisée : chaque région est à l'origine de parties déterminées du squelette crânien. Nous avons précisé cette régionalisation, et montré qu'elle n'était pas immuable puisque des phénomènes de régulation se produisent très largement lorsque l'intégrité de la crête neurale est atteinte. Cette régulation s'exerce par l'intervention de cellules provenant des régions voisines, situées du côté opposé ou du côté opéré.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Hörstadius et Sellman (1946), mais nous avons observé que la crête neurale participe à la formation de la partie postérieure des trabécules, de la plaque basale, et des cartilages parachordaux, ce que ces auteurs n'avaient pu observer puisque les ablations de la crête neurale n'entraînent pas l'absence de ces cartilages. Il faut donc distinguer selon leur origine trois types de cartilages crâniens : ceux qui dérivent entièrement de la crête neurale (régions antérieures des trabécules, cartilage de Meckel, arc hyoïde, arcs branchiaux) ; ceux qui dérivent partiellement de la crête neurale (partie postérieure des trabécules,

plaque basale et cartilages parachordaux), et enfin un dernier cartilage qui ne dérive pas du tout de la crête neurale, le basibranchial 2.

La crête céphalique greffée dans la région troncale ne produit pas de cartilages, parce qu'elle n'a pas été soumise à l'action inductrice issue de l'endoderme pharyngien, et la crête troncale greffée dans la région céphalique n'en produit pas non plus, bien qu'elle soit alors soumise à cette action inductrice : elle n'est donc pas compétente pour répondre à cette action inductrice. Il y a ici une différence fondamentale entre la crête céphalique et la crête troncale.

— La crête céphalique est indispensable à la formation des dents ; les mêmes régions de cette crête produisent les cartilages porteurs de dents, et ces dents elles-mêmes. Les dents sont des organes complexes : seuls les odontoblastes sont issus de la crête neurale, mais leur présence conditionne la formation de la dent tout entière : ainsi les dents sont-elles tributaires de l'intégrité de la crête neurale céphalique. La crête troncale ne peut pas produire d'odontoblastes.

— Au contraire, la crête céphalique et la crête troncale ont les mêmes potentialités en ce qui concerne la production du mésenchyme et des cellules pigmentaires. Toutefois la région antérieure de la crête céphalique est plus particulièrement riche en futures cellules pigmentaires qui coloniseront le globe oculaire.

— Les ganglions crâniens ne sont pas issus de la crête neurale, mais de l'ectoderme céphalique adjacent à celle-ci, qui, sous l'action d'un stimulus inducteur dont l'origine n'est pas élucidée, devient apte à former les ganglions crâniens ; ceux-ci peuvent se former également à partir de lambeaux d'ectoderme ventral, implantés dans la région céphalique et soumis à l'action inductrice même à travers une couche de tissu mésodermique. Au stade du bourgeon caudal cette action inductrice a cessé. La théorie de l'origine placodique des ganglions crâniens est vérifiée.

— La partie la plus antérieure de la crête céphalique (segment 0-30°) devient le cerveau antérieur : le télencéphale et une grande partie du diencéphale sont formés par des cellules qui au stade neurula sont situées dans les bourrelets médullaires. Le mode de soudure des bourrelets médullaires n'est donc pas le même en avant et en arrière du point 30° : en avant de ce point, les bourrelets médullaires sont intégrés au cerveau, mais en arrière de ce point ils restent entièrement distincts du système nerveux et donnent naissance aux nombreux dérivés qui font l'objet de ce Mémoire.

— La crête neurale troncale se révèle, à plusieurs égards, bien différente de la crête céphalique : elle ne produit aucun cartilage squelettique, ni dans le tronc, ni dans la tête ; elle donne naissance aux ganglions rachidiens, alors que la crête céphalique ne joue aucun rôle dans la formation des ganglions crâniens ; elle contribue sur toute sa longueur à la formation de la partie dorsale de la moelle épinière.

— La crête neurale, céphalique et troncale, fournit une partie des cellules de la gaine de Schwann : dans les stades jeunes (jusqu'à l'éclosion : stade 35) toutes les cellules de Schwann présentes sont issues de la crête neurale. Ensuite de nouvelles cellules de Schwann apparaissent, issues de la moelle épinière. Cette double origine des cellules de Schwann, en deux générations successives, rend compte des divergences existant entre les auteurs qui n'avaient discerné que l'une ou l'autre de ces étapes. La présence dans tous les cas expérimentaux d'un nombre normal de cellules de Schwann est le résultat de ces deux processus qui peuvent se suppléer mutuellement.

— La totalité des cellules pigmentaires du tronc, le mésenchyme dorsal, la nageoire dorsale sont issus des crêtes neurales troncales ; les méninges dérivent partiellement des crêtes céphalique et troncale.

— Enfin, le problème de l'origine des ganglions sympathiques et des cellules chromaffines trouve sa solution : ces deux formations ont une origine commune, la crête neurale. Les sympathogonies, cellules-souches du système nerveux sympathique et de l'organe suprarénal, sont issues de la crête neurale au même moment que les autres dérivés, dès les stades 22 à 25, mais l'identification histologique des ganglions sympathiques et des cellules chromaffines ne devient possible qu'au cours de la métamorphose (stade 55 b).

La crête neurale se révèle ainsi comme une structure extrêmement complexe : ses potentialités, très nombreuses, ne sont pas identiques dans toutes les régions. L'aptitude à former du mésenchyme, des cellules pigmentaires et des cellules de Schwann, est présente dans toutes les parties de la crête neurale. Mais son rôle dans la formation du tissu nerveux est très différent suivant les régions : la crête troncale produit des ganglions nerveux, alors que la crête céphalique n'en produit pas.

Malgré cette remarquable diversité de ses dérivés, la crête neurale présente des possibilités étonnantes de régulation. Nous en avons mesuré l'ampleur à propos de chacun des dérivés étudiés, et nous avons montré que leur intervention rend sans intérêt un certain nombre d'opérations. Il nous a fallu tenir le plus grand compte de leur entrée en jeu pour le choix des opérations à réaliser, et pour l'interprétation des résultats. Une seule crête neurale droite ou gauche suffit à promouvoir une organogenèse normale. De même, l'ablation bilatérale d'un segment de crête neurale n'entraîne, si ce segment ne dépasse pas une certaine longueur, aucune déficience notable. Ces exemples entrent dans le cadre général des régulations embryonnaires et mettent en évidence l'existence de potentialités organogénétiques qui normalement n'entrent pas en jeu, mais qui peuvent s'exprimer à condition qu'un territoire voisin soit excisé ou remplacé par un territoire de potentialités différentes.

Ces possibilités de régulation ne sont pas les mêmes pour les différents dérivés de la crête neurale ; elles se révèlent beaucoup plus grandes pour les cellules pigmentaires, par exemple, que pour

les ganglions rachidiens ou les cellules de Rohon-Béard. Une telle régulation suppose en effet la migration de cellules venues des régions normales dans les régions opérées, et cette migration n'est pas aussi aisée pour tous les types cellulaires : impossible à partir du moment où les cellules sont intégrées dans un organe défini, elle reste possible pour des cellules isolées ou dispersées, comme le sont précisément les cellules pigmentaires.

— Des effets d'induction ont été mis en évidence à plusieurs reprises : action inductrice exercée sur la crête céphalique par l'endoderme pharyngien, action inductrice exercée par les odontoblastes sur l'épithélium buccal, et action inductrice subie par l'ectoderme céphalique para-neural. La détermination d'ensemble de la crête neurale est elle-même, selon Raven et Kloos (1945), le résultat d'une induction exercée par le toit de l'archentéron sur l'ectoderme.

Le Tableau XIV concrétise l'ensemble des résultats obtenus.

TABLEAU XIV.

	Dérivent de la crête neurale seule	Dérivent pour une part de la crête neurale
Crête neurale céphalique	Partie antérieure du neurocrâne	Partie postérieure du neurocrâne
	Splanchnocrâne (sauf basibranchial 2)	
	Odontoblastes	Dents (+ épith. buccal)
	Mésenchyme	
	Encéphale antérieur	
	Cellules pigmentaires	
Crête neurale tronçale	Ganglions rachidiens	Gaine de Schwann (+ moelle épinière)
	Cellules de Rohon-Béard	Mésenchyme latéral
	Cellules pigmentaires	
	Mésenchyme dorsal et nageoire dorsale	Méninges
	Ganglions sympathiques	
	Cellules chromaffines	

RÉSUMÉ

— La migration des cellules issues de la crête neurale est mise en évidence et suivie au cours de l'embryogenèse au moyen de marques colorées et de greffes orthotopiques de crête neurale marquée par la thymidine tritiée.

— La totalité du crâne est formée de cellules issues de la crête neurale céphalique, à l'exception de la partie postérieure du neurocrâne qui n'est que partiellement formée de cellules issues de la crête neurale, et du basibranchial 2 qui est totalement indépendant de la crête neurale.

La régionalisation précise de la crête céphalique est établie.

La crête troncale implantée dans la région céphalique n'est pas capable de produire des cartilages.

— La crête céphalique participe à la formation des dents : son rôle y est déterminant : la présence des odontoblastes, issus de la crête neurale, conditionne la formation de l'organe adamantin, donc la constitution de la dent. Ce sont les mêmes segments de la crête neurale qui produisent les cartilages porteurs de dents, et les dents elles-mêmes. La crête troncale ne peut produire d'odontoblastes.

— Le mésenchyme céphalique est entièrement issu de la crête neurale céphalique.

— Les ganglions crâniens ne sont pas issus de la crête neurale. La localisation des placodes ectodermiques correspondant à chaque ganglion est établie au stade neurula, au stade bourgeon caudal jeune, et au stade bourgeon caudal âgé. Le phénomène d'induction responsable de la détermination de ces placodes est mis en évidence. Il s'exerce encore au stade neurula, même à travers une couche de tissu mésodermique. Il ne s'exerce plus au stade bourgeon caudal.

— Le télencéphale et la plus grande partie du diencéphale sont formés par la crête neurale céphalique antérieure.

— Toutes les cellules pigmentaires, de la tête et du tronc, sont produites par la crête neurale.

— Contrairement au squelette crânien, le squelette troncal est totalement indépendant de la crête neurale.

— Les ganglions rachidiens, la partie dorsale de la moelle épinière, les cellules de Rohon-Béard sont entièrement issus de la crête neurale troncale.

— Les cellules de la gaine de Schwann présentes avant le stade 35 dérivent de la crête neurale. Celles qui se forment plus tard, et qui sont les plus nombreuses, ont pour origine la moelle épinière.

Les méninges sont partiellement issues de la crête neurale.

— Le mésenchyme dorsal et la nageoire dorsale sont produits par la crête neurale troncale.

— L'origine des sympathogonies et leur double différenciation en ganglions sympathiques et en cellules chromaffines sont établies : elles dérivent de la crête neurale troncale.

— Les cellules issues de la crête neurale subissent ou exercent des actions inductrices.

— A propos de chacune de ces formations, les résultats des auteurs antérieurs sont cités et confrontés avec nos résultats. Un tableau résume l'ensemble des résultats.

SUMMARY

— The migration of cells produced in the neural crest is shown and followed in the course of embryogenesis by means of colored marks and orthotopic grafts of neural crest labeled by tritiated thymidine.

— The entire skull is formed by cells issued from the cephalic neural crest with the exception of the posterior part of the neurocranium, which is only partially formed from cells of the crest, and the basibranchium 2 which is totally independent of the neural crest.

The precise location of the cephalic crest is established. A truncal neural crest implanted in the cephalic region is not capable of producing cartilage.

— The cephalic neural crest participates in the formation of the teeth : this is of great importance because the presence of the odontoblasts issued from the neural crest conditions the formation of the adamantine organ, and therefore the constitution of the tooth. The same segments of the crest which produce the cartilage foundations of the teeth produce the teeth themselves. The truncal crest cannot produce odontoblasts.

— The cephalic mesenchyme comes entirely from the cephalic neural crest.

— The cranial ganglia are not produced from the neural crest. The location of the ectodermic placodes corresponding to each ganglion is established at the neurula, tailbud and late tailbud stages. The phenomenon of induction responsible for the determination of these placodes is shown. This induction is still found at the neurula stage, even across a layer of mesodermal tissue. It disappears at the tailbud stage.

— The telencephalon and the majority of the diencephalon are formed by the anterior cephalic neural crest.

— All the pigment cells of the head and the body are produced by the neural crest.

— As opposed to the cranial skeleton, the truncal skeleton is totally independent of the neural crest.

— The spinal ganglia, the dorsal part of the spinal cord, and the Rohon-Béard cells are all entirely issued from the truncal neural crest.

— The Schwann sheath cells which exist before stage 35 come from the neural crest ; those which are formed later and which are more plentiful, come from the spinal cord. The meninges are partially issued from the neural crest.

— The dorsal mesenchyme and the dorsal fin are produced by the truncal neural crest.

— The origin of the sympathogonia and their double differentiation into sympathetic ganglia and chromaffin cells are shown : they are both issued from the neural crest.

— Neural crest cells are submitted to or exert inductive influences.

— For each of these formations, previous results are cited and confronted with the present ones. A table summing up these data is given.

BIBLIOGRAPHIE

Adams (A. E.) — 1924 — An experimental study of the development of the mouth in the amphibian embryo. *J. Exp. Zool.*, **40**, 311-379.

Adams (A. E.) — 1931 — Some effects of removal of endoderm from the mouth region of early *Amblystoma punctatum* embryos. *J. Exp. Zool.*, **58**, 147-163.

Alcala (S.) — 1934 — Le sympathique dans les premières périodes du développement. *Arquivo de Anat. e Antropologia*, **16**, 179-191.

Amano (M.), Messier (B.) et Leblond (C. P.) — 1959 — Specificity of labeled thymidine as a DNA precursor in radioautography. *J. Histochem. Cytochem.*, **7**, 153-155.

Balfour (F. M.) — 1878 — Monograph of the development of Elasmobranch fishes. Macmillan ed. Londres.

Barden (R. B.) — 1942 — The origin and development of chromatophores of the amphibian eye. *J. Exp. Zool.*, **90**, 479-519.

Béard (J.) — 1889 — The development of the peripheral nervous system of Vertebrates. Part. I : Elasmobranchii and Aves. *Quart. J. micr. Sci.*, **29**, 153-227.

Beetschen (J. C.) — 1960 — Recherches sur l'hétéroploïdie expérimentale chez un Amphibien Urodèle, *Pleurodeles waltlii* Michah. *Bull. Biol. France et Belgique*, **94**, 12-127.

Boyd (J. D.) — 1960 — Origin, development and distribution of chromaffin cells. *Ciba Foundation Symposium on Adrenergic Mechanisms*, **37**, 63-82.

Brachet (A.) — 1908 — Recherches sur l'ontogenèse de la tête chez les Amphibiens. *Arch. Biol.*, **23**, 162-257.

Bruni (A. C.) — 1915 — Appunti sullo sviluppo del sistema nervoso simpatico negli Amnioti. *Atti della reale Accademia della Science di Torino*, **51**, 969-986 et 1114-1130.

Camus (R.) — 1912 — Uber die Entwicklung des sympathischen Nervensystems beim Frosch. *Arkiv. f. Mikr. Anat.*, **81**, 1-52.

Caston (J. D.) — 1962 — Appearance of Cathecholamines during development of *Rana pipiens*. *Develop. Biol.*, **5**, 468-482.

Chibon (P.) — 1962 — Marquage nucléaire de blastulas et d'explants embryonnaires d'Amphibiens par la thymidine tritiée. Evolution des noyaux marqués au cours du développement. *C. R. Acad. Sc.*, **254**, 4508-4510.

Dalton (H. C.) — 1949 — Developmental analysis of genetic differences in pigmentation in the Axolotls. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **35**, 277-283.

Dalton (H. C.) — 1950 a — Comparison of white and black Axolotl chromatophores *in vitro*. *J. Exp. Zool.*, **115**, 17-36.

Dalton (H. C.) — 1950 b — Inhibition of chromatoblasts migration as a factor in the development of genetic differences in pigmentation in white and black Axolotls. *J. Exp. Zool.*, **115**, 151-173.

Dalton (H. C.) — 1953 — Relations between developing melanophores and embryonic tissues in the mexican Axolotl. in « Pigment Cell Growth ». *Acad. Press*, N.Y., 17-27.

De Beer (G. R.) — 1947 — The differentiation of neural crest cells into visceral cartilages and odontoblasts in *Amblystoma*, and a re-examination of the germ-layer theory. *Proc. Roy. Soc.*, B, **134**, 377-398.

Detwiler (S. R.) — 1927 — The effects of extensive muscle loss upon the development of spinal ganglia in *Amblystoma*. *J. Exp. Zool.*, **48**, 1-14.

Detwiler (S. R.) — 1937 — Observations upon the migration of neural crest cells, and upon the development of the spinal ganglia and vertebral arches in *Amblystoma*. *Am. J. Anat.*, **61**, 63-94.

Detwiler (S. R.) et Kehoe (K.) — 1939 — Further observations on the origin of the sheath cells of Schwann. *J. Exp. Zool.*, **81**, 415-435.

Detwiler (S. R.) et Van Dyke (R. H.) — 1934 — The development and function of deafferented fore limbs in *Amblystoma*. *J. Exp Zool.*, **68**, 321-346.

Diderholm (H.), Fichtelius (K. E.) et Linder (O.) — 1962 — Availability time of ^{3}H-label after administration of ^{3}H-thymidine *in vivo*. *Exp. Cell. Res.*, **27**, 431-435.

Dushane (G. P.) — 1934 — Pigment cells in Amphibia. *Science*, **80**, 620-621.

Dushane (G. P.) — 1935 — An experimental study of the origin of pigment cells in Amphibia. *J. Exp. Zool.*, **72**, 1-31.

Dushane (G. P.) — 1938 — Neural folds derivatives in the Amphibia : pigment cells, spinal ganglia, and Rohon-Béard cells. *J. Exp. Zool.*, **78**, 485-503.

Dushane (G. P.) — 1939 — The role of embryonic ectoderm and mesoderm in pigment production in Amphibia. *J. Exp. Zool.*, **82**, 193-215.

Flexner (L. B.) — 1929 — The development of the meninges in Amphibia : a study of normal and experimental animals. Carnegie Institution of Washington. Publication 394. *Contribution to Embryology*, **20**, 31-49.

Friedkin (M.), Tilson (D.) et Roberts (D. W.) — 1956 — Studies on desoxyribonucleic acid biosynthesis in embryonic tissues with thymidine C^{14}. *J. Biol. Chem.*, **220**, 627-637.

Gallien (L.) — 1952 — Elevage et comportement du Pleurodèle au Laboratoire. *Bull. Soc. Zool. France*, **77**, 456-461.

Gallien (L.) et Durocher (M.) — 1957 — Table chronologique du développement chez *Pleurodeles waltlii*. *Bull. Biol. France et Belgique*, **91**, 97-114.

Goodrich (E. S.) — 1930 — Studies on the structure and development of Vertebrates. Macmillan ed. Londres.

Goronowitsch (N.) — 1892 — Die axiale und die laterale Kopfmetamerie der Vogelembryonen. Die Rolle der sog. « Ganglienleisten » im Aufbaue der Nervenstämme. *Anat. Anz.*, **7**, 454-464.

Goronowitsch (N.) — 1893 — Weiteres über die ektodermale Entstehung von Skelettanlagen im Kopfe der Wirbeltiere. *Morph. Jahrb.*, **20**, 425-428.

Hammond (W. S.) et Yntema (C. L.) — 1947 — Depletions in the thoracolumbar sympathetic system following removal of neural crest in the chick. *J. Comp. Neur.*, **86**, 237-265.

Harrison (R. G.) — 1904 — Neue Versuche und Beobachtungen über die Entwicklung der peripheren Nerven der Wierbeltiere. *Niederrh. Ges. Natur. u. Heilkunde, Bonn*, B, 55-62.

Harrison (R. G.) — 1910 — The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. *J. exp. Zool.*, **9**, 787-848.

Harrison (R. G.) — 1921 — Experiments on the development of the gills in the amphibian embryo. *Biol. Bull.*, **41**, 156-170.

Harrison (R. G.) — 1924 — Neuroblast versus sheath cells in the development of peripheral nerves. *J. Comp. Neur.*, **37**, 123-205.

Harrison (R. G.) — 1925 — The development of the balancer in *Amblystoma* studied by the method of transplantation, and in relation to the connective tissue problem. *J. Exp. Zool.*, **41**, 349-428.

Hilber (H.) — 1944 — Experimentelle Studien zum Schicksal des Rumpfganglienleistenmaterials. *Arch. Entwickl.-Mech. Org.*, **142**, 100-120.

His (W.) — 1868 — Untersuchungen über die erste Anlage des Wierbeltierleibes. Die erste Entwicklung des Hühnchens im Ei-F.C.W. Vogel. Leipzig.

His (W.) — 1879 — Uber die Anfänge des peripherischen Nervensystems. *Arch. Anat. u. Physiol., Anat. Abt.*, 456-482.

His (W.) — 1897 — Uber die Entwicklung des Bauchsympathicus beim Hühnschen und Menschen. *Arch. Anat. u. Physiol., Anat. Abt.*, Supplement, 137-170.

Holtfreter (J.) — 1933 — Der Einfluss von Wirtsalter und verschiedenen Organbezirken auf die Differenzierung von angelagertem Gastrulaektoderm. *Arch. Entwickl.-Mech. Org.*, 127, 619-775.

Hörstadius (S.) — 1950 — The neural crest. Oxford University Press.

Hörstadius (S.) et Sellman (S.) — 1946 — Experimentelle Untersuchungen über die Determination des knorpeligen Kopfskelettes bei Urodelen. *Nova Acta Reg. Soc. Sci. Upsaliensis*, ser. 4, 13, 1-170.

Hughes (W. L.), Bond (V. P.), Brecher (G.), Cronkite (E. P.), Painter (R. B.), Quastler (H.) et Shermann (F. G.) — 1958 — Cellular proliferation in the mouse as revealed by autoradiography with tritiated thymidine. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 44, 476-483.

Ichikawa (M.) — 1933 a — Experiments on the gill formation in the Urodelian Triturus. *Mem. Coll. Sci. Kyoto Imp. Univ.*, série B, 9, 47-69.

Ichikawa (M.) — 1933 b — Remarks on the investigation of the origin of visceral cartilages by means of staining. *Proc. Imp. Acad. Tokyo*, 9, 117-119.

Ichikawa (M.) — 1937 — Experiments on the amphibian mesectoderm with special reference to the cartilage formation. *Mem. Coll. Sci. Kyoto Imp. Univ.*, série B, 12, 312-351.

Johnston (M. C.) — 1964 — Derivatives of the cranial neural crest in the chick embryo. *Anat. Rec.*, 148, 295.

Jones (D. S.) — 1937 — The origin of the sympathetic trunks in the chick embryo. *Anat. Rec.*, 70, 45-62.

Jones (D. S.) — 1939 — Studies on the origin of sheath cells and sympathetic ganglia in the chick. *Anat. Rec.*, 73, 343-357.

Jones (D. S.) — 1941 — Further studies on the origin of sympathetic ganglia in the chick embryo. *Anat. Rec.*, 79, 7-15.

Kastchenko (N.) — 1888 — Zur Entwicklungsgeschichte der Selachierembryos. *Anat. Anz.*, 3, 445-467.

Knouff (R. A.) — 1927 — The origin of the cranial ganglia in *Rana*. *J. Comp. Neur.*, 44, 259-361.

Kohn (A.) — 1902 — Das chromaffine Gewebe. *Ergeb. Anat. Entwicklungsgeschichte*, 12, 253-348.

Kuntz (A.) — 1922 — Experimental studies on the histogenesis of the sympathetic nervous system. *J. Comp. Neur.*, 34, 1-36.

Kuntz (A.) et Batson (O. V.) — 1920 — Experimental observations on the histogenesis of the sympathetic trunks in the chick. *J. Comp. Neur.*, 32, 335-345.

Landacre (F. L.) — 1921 — The fate of the neural crest in the head of the Urodeles. *J. Comp. Neur.*, 33, 1-43.

La Spina (R.) — 1963 — Analisi sperimentale del disegno pigmentato di *Discoglossus pictus*. *Acta Embryol. Morphol. exper.*, 6, 11-20.

Lehmann (F.) — 1950 — The suppression of melanophore differentiation in Salamander larvae following orthotopic exchanges of neural folds between species of *Amblystoma* and *Triturus*. *J. Exp. Zool.*, 114, 435-464.

Lehmann (F.) et Youngs (L. M.) — 1952 — An analysis of regulation in the Amphibian neural crest. *J. Exp. Zool.*, 121, 419-447.

Levi-Montalcini (R.) — 1947 — Ricerche sperimentali sull'origine del simpatico toraco-lombare nell'embrione di pollo. *Rend. Accad. Naz. Lincei*, ser. 8, 3, 140-144.

Loeffler (C. A.) et Johnston (M. C.) — 1964 — Permeability alterations in amphibian embryos caused by salt solutions and measured by tritiated thymidine uptake. *J. Embryol. exp. Morph.*, 12, 407-424.

Muller (E.) et Ingvar (S.) — 1921 — Uber den Ursprung des Sympathicus bei den Amphibien. *Upsala Läkareförenings Forh.*, 26, XXIII, 1-15.

Muller (E.) et Ingvar (S.) — 1923 — Uber den Ursprung des Sympathicus beim Hühnchen. *Arch. Mikr. Anat. u. Entwickl.*, 99, 650-671.

Newth (D. R.) — 1954 — Determination of the cranial neural crest of the Axolotl. *J. Embryol. exp. Morph.*, 2, 101-105.

Nieuwkoop (P. D.), Niermeyer (E. K.) et Jansen (W. F.) — 1964 — When and how pattern formation begins in the presumptive prosencephalon. *J. Anim. Morphol. and Physiol.*, 11, 21-44.

Niu (M. C.) — 1947 — The axial organisation of the neural crest, studied with particular reference to its pigmentary components. *J. Exp. Zool.*, 105, 79-114.

Oberling (C.) — 1922 — Les tumeurs des méninges. *Bull. Ass. Franç. p. l'étude du Cancer*, 11, 365-394.

Obika (M.) — 1963 — Association of pteridines with amphibian larval pigmentation and their biosynthesis in developing chromatophores. *Develop. Biol.*, 6, 99-112.

Okada (E. W.) — 1955 — Isolationsversuche zur Analyse der Knorpelbildung aus Neuralleistenzellen bei Urodelekeim. *Mem. Coll. Sci. Univ.* Kyoto, B, 22, 23-28.

Pawlikowski (T.) — 1934 a — Développement du système chromaffine ou adrénal, et son fonctionnement précoce chez *Amblystoma mexicanum*. *C. R. Soc. Biol.*, Paris, 115, 1261-1264.

Pawlikowski (T.) — 1934 b — Sur le fonctionnement précoce du système interrénal chez *Amblystoma mexicanum*. *C. R. Soc. Biol.*, Paris, 115, 1265-1266.

Petriconi (V.) — 1964 — Entwicklungsphysiologische Untersuchungen über die Induzierbarkeit von Skelettelementen des Anurenschädels durch flussigen Organextrakt. *Arch. Entwickl.-Mech. Org.*, 155, 358-390.

Piatt (J.) — 1951 — Transplantation experiments between pigmentless and pigmented eggs of *Amblystoma punctatum*. *J. Exp. Zool.*, 118, 101-136.

Platt (J. B.) — 1893 — Ectodermic origin of the cartilages of the head. *Anat. Anz.*, 8, 506-509.

Platt (J. B.) — 1897 — The development of the cartilaginous skull and of the branchial and hypoglossal musculature in *Necturus*. *Morph. Jahrb.*, 25, 377-464.

Quertier (J.) — 1962 — Etude autoradiographique du métabolisme des acides nucléiques et des protéines chez des neurulas de Batraciens traitées au β-mercaptoethanol. *Acta Embryol. Morph. exp.*, 5, 57-70.

Raunich (L.) — 1951 — Über die Anlage des Telencephalons in der Neurula der Amphibien und die Faktoren seiner bilateralen Ausbildung. *Exper.*, 7, 300-305.

Raven (C. P.) — 1932 — Zur Entwicklung der Ganglienleiste : I. Die Kinematik der Ganglienleistenentwicklung bei den Urodelen. *Arch. Entwickl.-Mech Org.*, 125, 210-292.

Raven (C. P.) — 1933 a — Zur Entwicklung der Ganglienleiste : II. Uber die Differenzierung des Kopfganglienleistenmaterials von *Rana fusca*. *Arch. Entwickl.-Mech. Org.*, 129, 179-198.

Raven (C. P.) — 1933 b — Zur Entwicklung der Ganglienleiste : III. Die Induktionfähigkeit des Kopfganglienleistenmaterials von *Rana fusca*. *Arch. Entwickl.-Mech. Org.*, 130, 517-561.

Raven (C. P.) — 1935 — Zur Entwicklung der Ganglienleiste : IV. Untersuchungen über Zeitpunkt und Verlaufder « materiellen Determination » des präsumptiven Kopfganglienleistenmaterials der Urodelen. *Arch. Entwickl.-Mech. Org.*, 132, 509-575.

Raven (C. P.) — 1936 — Zur Entwicklung der Ganglienleiste : V. Uber die Differenzierung des Rumpfganglienleistenmaterials. *Arch. Entwickl.-Mech. Org.*, 134, 122-146.

Raven (C. P.) — 1937 — Experiments on the origin of the sheath cells and sympathetic neuroblasts in Amphibia. *J. Comp. Neur.*, 67, 221-240.

Raven (C. P.) et Kloos (J.) — 1945 — Induction by medial and lateral pieces of the archenteron roof with special reference to the determination of the neural crest. *Acta Neerl. Morph.*, 5, 348-362.

Sagemehl (M.) — 1882 — Untersuchungen über die Entwicklung der Spinalnerven. C. Mattiesen. Dorpat.

Sauer (M. E.) et Walker (B. E.) — 1961 — Radiation injury resulting from nuclear labeling with tritiated thymidine in the chick embryo. *Radiation Research*, 14, 633-642.

Signoret (J.) - 1960 — Céphalogenèse chez le Triton *Pleurodeles waltlii* Michah. après traitement de la gastrula par le chlorure de lithium. *Mém. Soc. Zool. France*, 32, 1-117.

Stone (L. S.) — 1922 a — Some notes on the migration of neural crest in *Rana palustris*. *Anat. Rec.*, 23, 39-40.

Stone (L. S.) — 1922 b — Experiments on the development of the cranial ganglia and the lateral line sense organs in *Amblystoma punctatum*. *J. Exp. Zool.*, 35, 421-496.

Stone (L. S.) - 1924 — Experiments on the transplantation of the cranial ganglia in the amphibian embryo. I. Heterotopic transplantation of the ophtalmic placode upon the head of *Amblystoma punctatum*. *J. Comp. Neur.*, 38, 73-105.

Stone (L. S.) — 1926 — Further experiments on the extirpation and transplantation of mesectoderm in *Amblystoma punctatum*. *J. Exp. Zool., 44*, 95-131.

Stone (L. S.) — 1927 — Further experiments on the transplantation of neural crest (mesectoderm) in Amphibians. *Proc. Soc. exper. Biol. a. Med.*, 24, 945-948.

Stone (L. S.) — 1929 — Experiments showing the role of migrating neural crest (mesectoderm) in formation of head skeleton and loose connective tissue in *Rana palustris*. *Arch. Entwickl.-Mech. Org.*, 118, 40-77.

Stone (L. S.) — 1932 — Transplantation of hyobranchial mesentoderm, including the right lateral anlage of the second basibranchium in *Amblystoma punctatum*. *J. Exp. Zool.*, 62, 109-123.

Stroer (W.) — 1933 — Experimentelle Untersuchungen über die Mundentwicklung bei den Urodelen. *Arch. Entwickl.-Mech. Org.*, 130, 131-186.

Swick (R. W.), Koch (A. L.) et Handa (D. T.) — 1956 — The measurement of nucleic acid turnover in rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.*, 63, 226-242.

Tencer (R.) — 1961 — Incorporation of tritium-labeled thymidine in *Bufo* ♀ × *Rana temporaria* ♂ hybrids embryos. *Nature*, 190, n° 4770, 100-101.

Trinkhaus (J. P.) et Gross (M.) — 1961 — The use of tritiated thymidine for marking migratory cells. *Exp. Cell Res.*, 24, 52-57.

Triplett (E. L.) — 1958 — The development of the sympathetic ganglia, sheath cells, and meninges in Amphibia. *J. Exp. Zool.*, 138, 283-311.

Twitty (V. C.) et Bodenstein (D.) — 1944 — The effect of temporal and regional differentials on the development of grafted chromatophores. *J. Exp. Zool.*, 95, 213-231.

Twitty (V. C.) et Niu (M. C.) — 1954 — The motivation of cell migration, studied by isolation of embryonic pigment cells singly and in small groups *in vitro*. *J. Exp. Zool.*, 125, 541-573.

Van Campenhout (E.) — 1930 a — Historical survey of the development of the sympathetic nervous system. *Quart. Rev. Biol.*, 5, 23-50 et 217-234.

Van Campenhout (E.) — 1930 b — Contribution to the problem of the development of the sympathetic nervous system. *J. Exp. Zool.*, 56, 295-320.

Van Campenhout (E.) — 1931 — Le développement du système nerveux sympathique chez le poulet. *Arch. Biol.*, Paris, 42, 479-507.

Van Campenhout (E.) — 1935 — Experimental researches on the origin of the acoustic ganglion in Amphibian embryos. *J. Exp. Zool.*, 72, 175-193.

Vogt (W.) — 1925 — Gestaltungsanalyse am Amphibienkeim mit örtlicher Vitalfärbung. I. Methodik und Wirkungsweise der örtlichen Vitalfärbung mit Agar als Farbträger. *Arch. Entwickl.-Mech. Org.*, 106, 542-610.

Vogt (W.) — 1929 — Gestaltungsanalyse am Amphibienkeim mit örtlicher Vitalfärbung. II. Gastrulation und Mesodermbildung bei Urodelen und Anuren. *Arch. Entwickl.-Mech. Org.*, 120, 384-706.

Volpe (E. P.) — 1963 — Interplay of mutant and wild-type pigment cells in chimeric leopard frog. *Develop. Biol.*, 8, 205-221.

Volpe (E. P.) — 1964 — Fate of neural crest homotransplants in pattern mutants of the leopard frog. *J. Exp. Zool.*, 157, 179-196.

Von Woellwarth (C.) — 1960 — Uber das Anlagenmuster und die Kinematik des Ektoderms, insbesondere des präsumptiven Epidermis, im Neurula- und Swanzknospenstadium von *Tritutrus alpestris*. *Arch. Entwickl.-Mech. Org.*, 152, 602-631.

Wagner (G.) — 1949 — Die Bedeutung der Neuralleiste für die Kopfgestaltung der Amphibienlarven. Untersuchungen an Chimaeren von Triton. *Rev. Suisse Zool.*, 56, 519-620.

Weston (J. A.) — 1963 — A radioautographic analysis of the migration and localization of trunk neural crest cells in the chick. *Develop. Biol.*, 6, 279-310.

Wilde (C. E.) — 1951 — An *in vitro* study of the Urodele cranial neural crest. *Anat. Rec.*, 111, 92-93.

Wilde (C. E.) — 1955 a — The urodele neuro-epithelium. I. The differentiation *in vitro* of cranial neural crest. *J. Exp. Zool.*, 130, 573-591.

Wilde (C. E.) — 1955 b — The Urodele neuro-epithelium. II. The relationship between phenylalanine metabolism and the differentiation of neural crest cells. *J. Morphol.*, 97, 313-344.

Wilde (C. E.) — 1956 — The Urodele neuro-epithelium. III. The presentation of phenylalanine to the neural crest by archenteron roof mesoderm. *J. Exp. Zool.*, 133, 409-440.

Woerdeman (M.) — 1946 — On induction of a dorsal fin by the neural crest in Axolotl embryos. *Acta Neerl. Morph.*, 5, 378-384.

Woerdeman (M.) et Raven (C. P.) — 1946 — Experimental Embryology in the Netherlands 1940-1945. Elsevier Publ., Amsterdam et New-York.

Yntema (C. L.) — 1937 — An experimental study of the origin of the cells which constitute the VIIth and VIIIth ganglions and nerves in the embryo of *Amblystoma punctatum*. *J. Exp. Zool.*, 75, 75-101.

Yntema (C. L.) — 1943 — An experimental study of the origin of the sensory neurons and sheath cells of the IXth and Xth cranial nerves in *Amblystoma punctatum*. *J. Exp. Zool.*, 92, 93-119.

Yntema (C. L.) et Hammond (W. S.) — 1945 — Depletions and abnormalities in the cervical sympathetic system of the chick following extirpation of neural crest. *J. Exp. Zool.*, 100, 237-263.

Yntema (C. L.) et Hammond (W. S.) — 1947 — The development of autonomic nervous system. *Biol. Rev.*, 22, 344-359.

Zwilling (E.) — 1940 — An experimental analysis of the development of the anuran olfactory organ. *J. Exp. Zool.*, 84, 291-323.

DEUXIÈME THÈSE.

Propositions données par la Faculté :

L'acquisition de la pigmentation spécifique chez les Vertébrés

---

Vu et approuvé :
Paris, le 11 Mars 1966.
Le Doyen de la Faculté des Sciences,
Marc ZAMANSKY.

Vu
et Permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
Jean ROCHE.

Achevé d'imprimer le 14 Avril 1966.

M. DECLUME imprimeur, Lons-le-Saunier. — 232-66-200.
Avril 1966 « Dépôt légal 2e trimestre 1966 — N° 5739 ».

PLANCHES

Planche I.

Larves ayant subi au stade neurula l'ablation bilatérale des crêtes neurales troncales.

1. Stade 31. La nageoire dorsale et les cellules pigmentaires manquent sur toute la longueur de tronc.
2. Même individu au stade 37.
3. Stade 38. Larve ayant subi l'ablation des deux premiers tiers des crêtes troncales ; la région antérieure du tronc est entièrement dépourvue de nageoire dorsale et de cellules pigmentaires ; dans la région moyenne, les cellules pigmentaires migrent en direction antérieure, à partir de la région non opérée (la flèche indique le début de la nageoire dorsale).
4. Stade 54. La nageoire dorsale est presque totalement absente, mais les cellules pigmentaires ont recolonisé presque entièrement la région opérée. Les guanophores font défaut dans la région moyenne du tronc.

Greffes de crête neurale sur la face ventrale de neurulas :

5. Greffe de crête troncale : larve au stade 36. Les mélanophores se dispersent autour du greffon et s'étendent sur la face ventrale.
6. Greffe de crête céphalique 0-60° : larve au stade 38 : le greffon forme une excroissance entièrement couverte de mélanophores et de guanophores.

Larves ayant subi au stade neurula des ablations bilatérales partielles de crête céphalique, greffées en parabiose sur un porteur normal :

7. Ablation bilatérale 0-30° : larves au stade 38. Noter le raccourcissement de la tête et la position des yeux, reportés en avant.
8. Ablation bilatérale 120-150° : stade 40. La tête est rétrécie à sa partie postérieure, et ne porte de chaque côté qu'un seul filament branchial externe, très petit et non ramifié.
9. Ablation bilatérale 0-30° : stade 47. Vue de face d'une larve opérée : noter la position des yeux, reportés sur l'avant de la tête, et au contact l'un de l'autre.

L'échelle des fig. 3, 5, 6, 7, 8 est indiquée à la fig. 3.

Planche I.

Planche II.

Neurulas marquées *in toto* après injection de thymidine tritiée au stade blastula :

10. Neurula marquée *in toto* au stade 16. Coupe transversale dans la région troncale. Tous les noyaux sont intensément marqués.

11. Tube nerveux présomptif et crêtes neurales troncales de la neurula précédente. La crête neurale prélevée dans nos opérations est contenue dans le rectangle noir.

Embryons ayant reçu au stade neurula une greffe bilatérale de crête neurale marquée. Les noyaux marqués apparaissent en blanc (objectifs Leitz Ultropak).

12. Stade 20. Le tube nerveux et l'ectoderme qui le recouvre sont marqués.

13. Stade 24. En plus du marquage du tube nerveux et de l'ectoderme dorsal, des cellules marquées sont visibles des deux côtés entre l'ectoderme et les somites.

14. Stade 24. Dans la région du rhombencéphale, les cellules marquées se trouvent tout autour du tube nerveux et sous l'ectoderme.

15. Stade 25. Des files de cellules marquées s'observent sous l'ectoderme de chaque côté.

16. Stade 30. En plus de la partie dorsale de la moelle épinière, des cellules marquées sont présentes dans l'épiderme et le mésenchyme de la nageoire dorsale, et sous l'épiderme (du côté gauche).

17. Stade 30. Les cellules marquées sont très dispersées : ganglion rachidien du côté gauche, cellules de Schwann du côté droit, cellules pigmentaires sur les flancs et au plafond de la cavité générale.

L'échelle des fig. 11 à 17 est indiquée à la fig. 11.

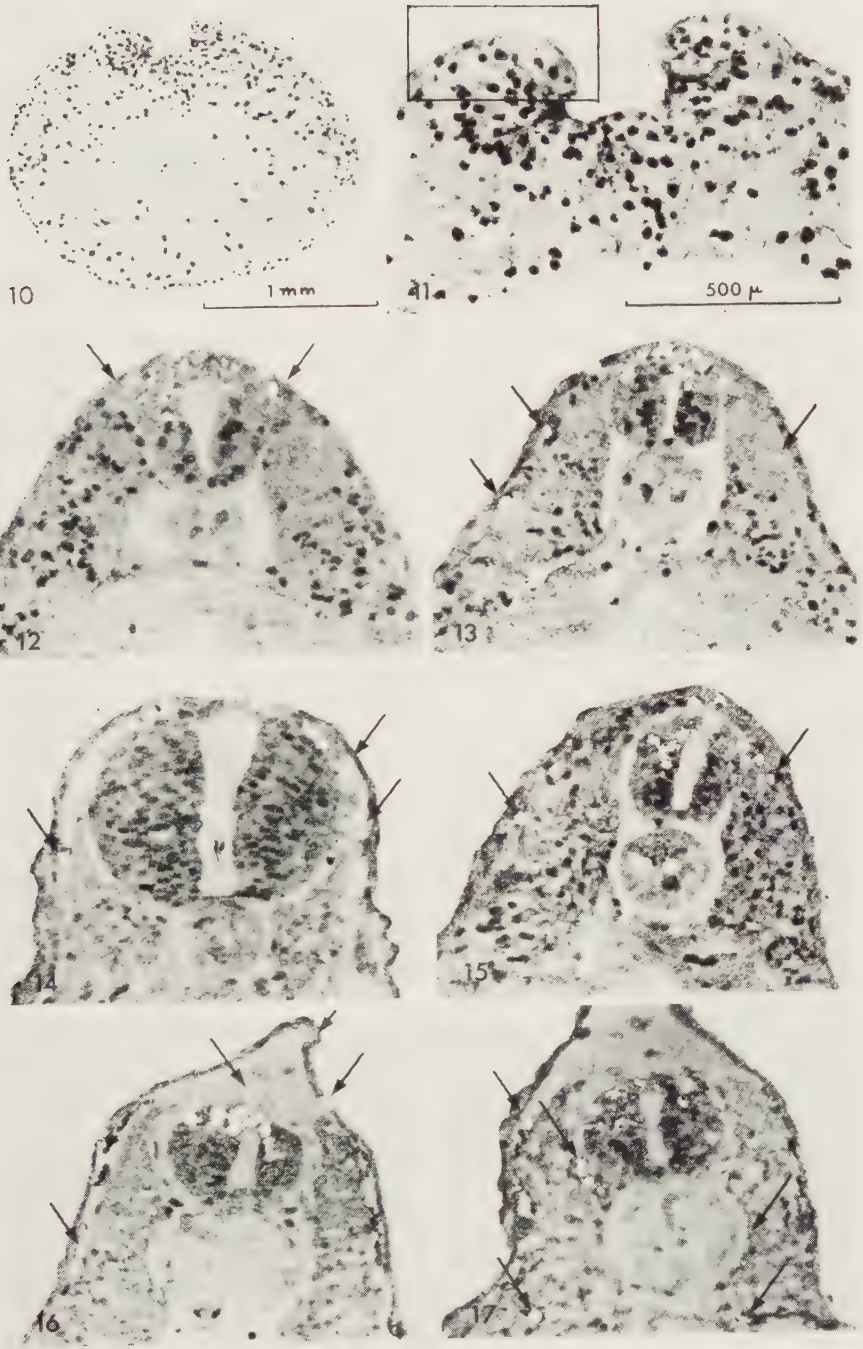

Planche II.

Planche III.

Ganglions crâniens marqués
après greffes orthotopiques d'ectoderme para-neural marqué :

18. Ganglion V marqué après greffe orthotopique de l'ectoderme de la région 70-120°.

19. Ganglion VII-VIII et oreille interne marqués après greffe de l'ectoderme de la région 70-120°. Or : oreille interne.

20. Ganglion IX-X marqué après greffe de l'ectoderme 90-150°.

Ganglions crâniens marqués après greffe d'ectoderme ventral banal
à la place de l'ectoderme para-neural céphalique :

21. Ganglion VII-VIII marqué après greffe d'ectoderme ventral marqué.

22. Ganglion IX-X marqué après greffe d'un lambeau double d'ectoderme et de mésoderme banals marqués.

Culture d'explants de crête neurale :

23. Exemple d'explant de crête céphalique, après 8 jours de culture ; l'ectoderme a formé une sphère sous la surface de laquelle les mélanophores sont dispersés.

Squelette crânien et dents marqués
apres greffes orthotopiques de crête neurale céphalique marquée :

24. Trabécule marqué après greffe 0-90°.

25. Cartilage parachordal marqué après greffe 0-90°. Ch : chorde dorsale.

26. Cartilage de Meckel marqué après greffe 45-120°.

27. 2e arc branchial marqué après greffe 120-150°,

28. Dent palatine marquée après greffe 30-70°. Seuls les odontoblastes sont marqués. Cb : cavité buccale.

29. Dent mandibulaire marquée après greffe 70-100°. Les odontoblastes, le cartilage de Meckel (CM) et le mésenchyme environnant sont marqués.

L'échelle de toutes les figures (sauf fig. 23) est indiquée à la fig. 28.

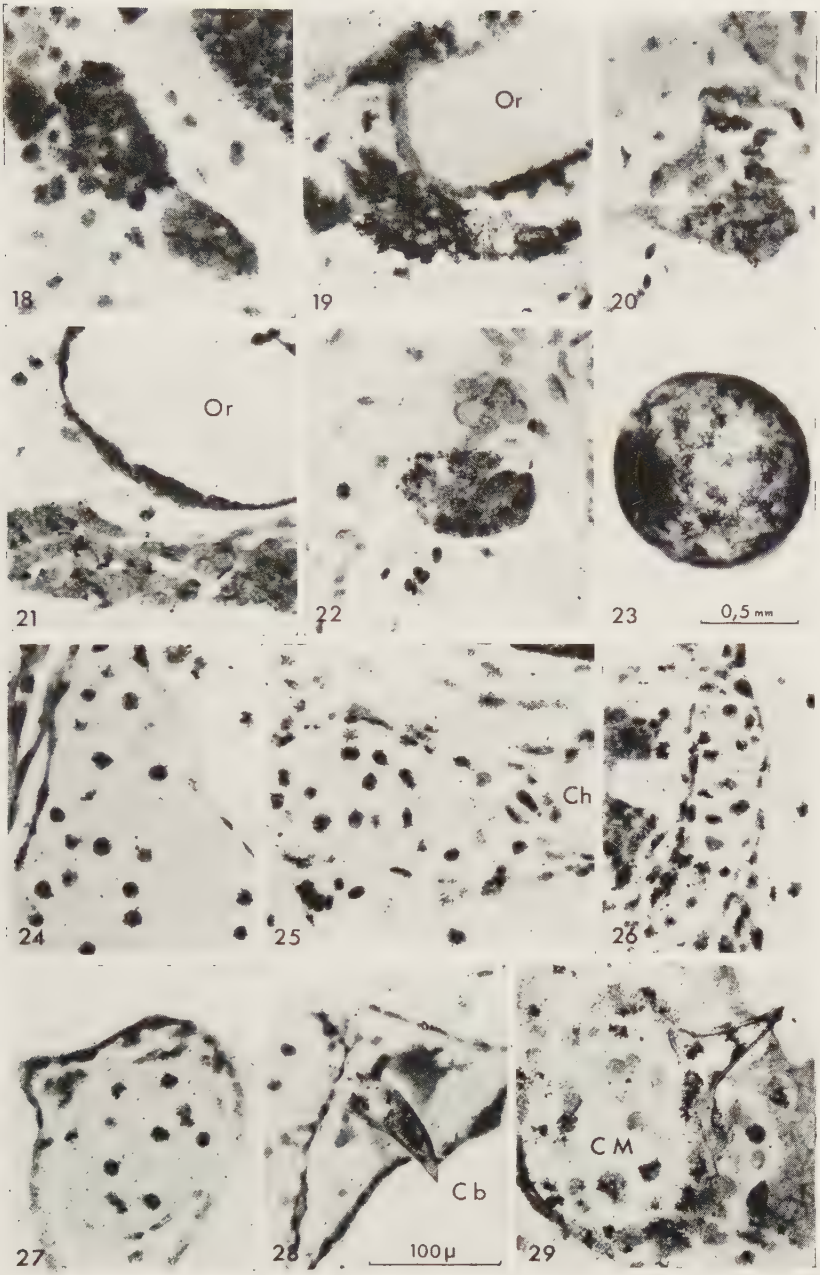

Planche III.

Planche IV.

Comparaison au stade 38 entre une larve témoin
et une larve ayant subi l'ablation bilatérale des crêtes neurales troncales :

30. Coupe transversale dans la région troncale de la larve témoin : la nageoire dorsale est présente, le mésenchyme abondant, les ganglions rachidiens sont présents ; une cellule de Rohon-Béard est visible à la partie dorsale de la moelle épinière. Plusieurs mélanophores sont présents sous l'épiderme.

31. Larve opérée : la nageoire dorsale est absente, et le mésenchyme très réduit ; les somites sont soudés en une seule masse au dessus de la moelle épinière, et l'épiderme est directement appliqué sur les somites. La moelle épinière est réduite ; il n'y a ni cellules de Rohon-Béard, ni ganglions rachidiens, ni mélanophores.

32. Ganglions rachidiens marqués après greffe orthotopique bilatérale de crêtes neurales troncales marquées. Quelques cellules marquées sont présentes à la partie dorsale de la moelle épinière.

33. Cellule de Rohon-Béard chez une larve témoin au stade 38 : elle possède un gros noyau rond et un cytoplasme clair.

34. Cellule de Rohon-Béard marquée après greffe orthotopique de crête troncale marquée. Quelques autres cellules marquées s'observent à la partie dorsale de la moelle épinière.

Cellules de Schwann :

35. Départ de la racine ventrale d'un nerf rachidien chez une larve au stade 51, après ablation bilatérale des crêtes troncales : il n'y a pas de ganglion rachidien, mais les cellules de la gaine de Schwann reconnaissables à leur noyau allongé et aplati, sont présentes. M ep : moelle épinière. Ch : chorde dorsale .

36. Cellules de la gaine de Schwann marquées après greffe orthotopique bilatérale de crêtes troncales marquées. Larve au stade 32 b.

37. Mélanophores marqués sous l'épiderme et au plafond de la cavité générale après greffe orthotopique de crêtes troncales marquées. Les noyaux marqués apparaissent en blanc grâce à l'éclairage en lumière incidente (objectif Leitz Ultropak) et le pigment, réparti dans le cytoplasme, apparaît en noir.

38. Nageoire dorsale et mésenchyme marqués après greffe orthotopique de crêtes troncales marquées.

L'échelle des fig. 30 et 31 est indiquée à la fig. 30 ;
l'échelle des fig. 32 à 38 est indiquée à la fig. 32 (sauf fig. 37).

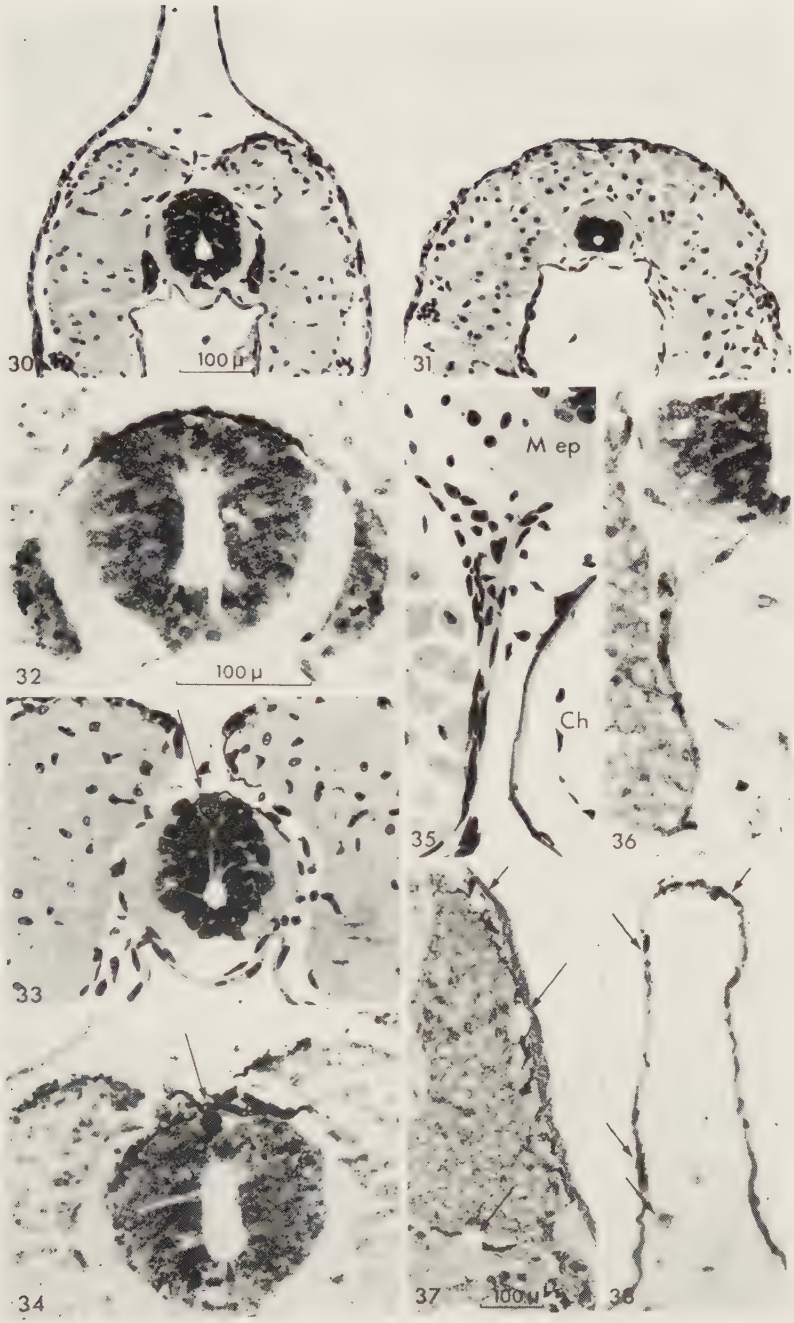

Planche IV.

Planche V.

Participation de la crête neurale à la formation de l'encéphale antérieur :

39. Hémisphères cérébraux et conduits olfactifs marqués après greffe orthotopique 0-30°. (Entre les conduits olfactifs, pièce cartilagineuse impaire formée par la fusion des extrémités antérieures des trabécules).

40. Région ventrale du diencéphale marquée.

Sympathogonies marquées
après greffes orthotopiques de crêtes troncales marquées :

41. et 42. 2 exemples de sympathogonies marquées au stade 38 : elles sont localisées sous la chorde dorsale (Ch), près de l'aorte (Ao) et de l'uretère primaire (Up). Int : intestin.

43. Ganglion sympathique (Gs) chez une larve témoin en fin de métamorphose (stade 55 b). Ao : aorte.

44. et 45. Exemples de cellules chromaffines chez des larves témoins au stade 55 c : elles sont situées au voisinage immédiat de la veine cave postérieure (Vcp), et sont reconnaissables à leur noyau foncé et à leur cytoplasme étoilé coloré en brun par la réaction chromaffine.

L'échelle des fig. 40 à 43 est indiquée à la fig. 40 ;
l'échelle des fig. 44 et 45 est indiquée à la fig. 45.

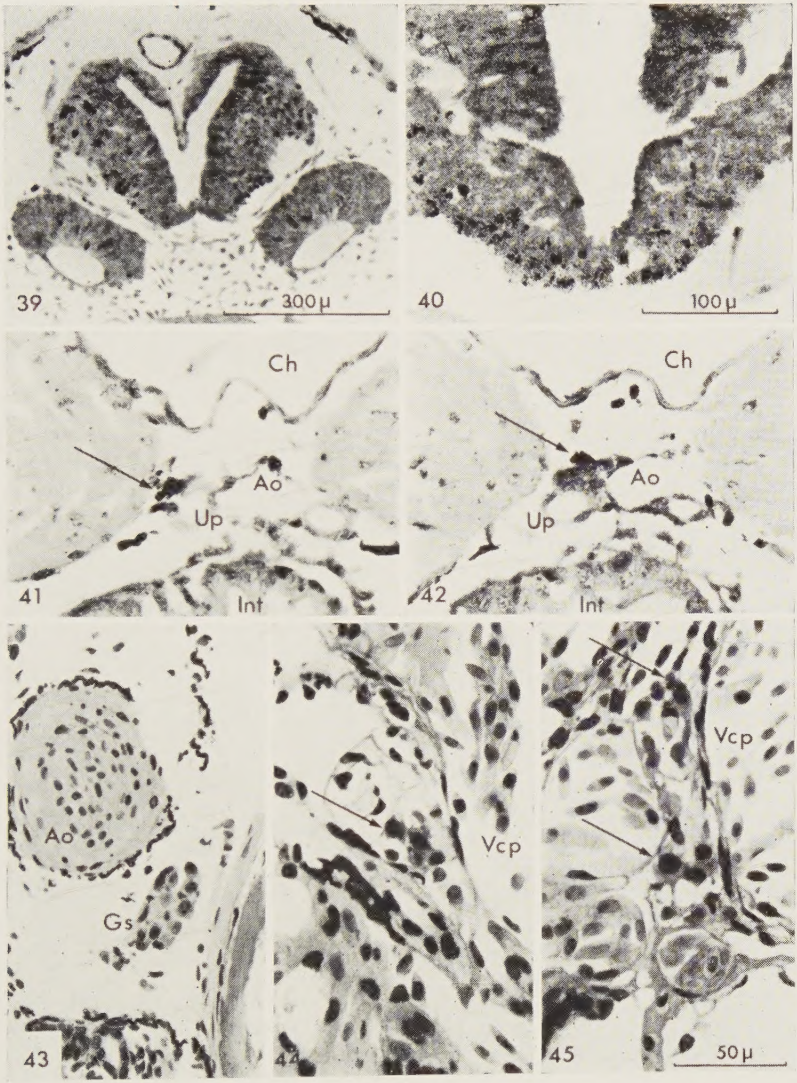
39
300 µ
40
100 µ
Ch
Ao
Up
41
Int
Ch
Ao
Up
42
Int
Ao
Gs
43
Vcp
44
Vcp
45
50 µ

Planche V.

Printed in France.